



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Uso de ciclodextrinas para la protección de la oxidación de antioxidantes naturales o-difenólicos presentes en alimentos. Determinación voltamperométrica de las constantes de equilibrio de los complejos de inclusión.

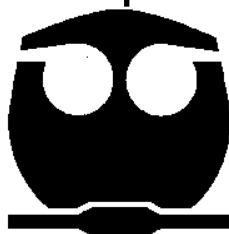
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ELISA MARÍA MEJÍA JÁCOME



México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Facultad de Química, UNAM

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Pedro Villanueva González

VOCAL: Prof. Martha Aguilar Martínez

SECRETARIO: Prof. Lucia Cornejo Barrera

1er. SUPLENTE: Prof. María de Lourdes Osnaya Suárez

2° SUPLENTE: Prof. Norma Angélica Macías Ruvalcaba

Sitio donde se desarrolló el trabajo de tesis:

Edificio A, Laboratorio de Electroquímica Molecular (Anexo 4F), Facultad de Química,
UNAM

TUTOR DE TESIS

Dra. Martha Aguilar Martínez

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba

SUSTENTANTE

Elisa María Mejía Jácome

ÍNDICE GENERAL		Página
i .	Productos de la Investigación.	VI
ii	Agradecimientos.	VII
iii	Glosario.	X
iv.	Introducción.	XIV
1.	Capítulo 1.	
	Antecedentes.	
1.1	Reacciones de óxido reducción.	2
1.2	Radicales libres.	3
1.3	Oxígeno.	4
1.4	Degradación lipídica.	5
1.5	Oxidación de fenoles.	9
1.6	Conceptos básicos de los antioxidantes.	10
1.6.1	Antioxidantes naturales presentes en los alimentos.	12
1.7	Derivados o-difenólicos.	15
1.8	Oscurecimiento en productos alimenticios.	17
1.8.1	Oscurecimiento enzimático.	18
1.8.2	Métodos usados contra el oscurecimiento enzimático.	19
1.9	Polifenol oxidasa.	20
1.10	Aspectos generales de las ciclodextrinas.	23
1.10.1	Propiedades físicas de las ciclodextrinas.	25
1.10.2	Degradación y toxicidad de las ciclodextrinas.	26
1.10.3	Principales usos de las ciclodextrinas.	27
	Elisa María Mejía Jácome	III

1.10.4	Formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y moléculas orgánicas.	28
2.	Capítulo 2. Hipótesis y objetivos	31
3.	Capítulo 3. Experimental.	
3.1	Equipo y material empleado.	34
3.2	Reactivos.	35
3.3	Metodología.	36
3.3.1	Preparación de las ciclodextrinas.	36
3.3.2	Determinaciones voltamperométricas de los ácidos o-difenólicos protocatecuico, cafeico y clorogénico.	37
4.	Capítulo 4 Resultados y Discusión	
4.1	Mecanismo de la oxidación electroquímica de los ácidos o-difenólicos protocatecuico, cafeico y clorogénico por voltamperometría cíclica.	40
4.2	Simulación digital	43
4.3	Oxidación de los ácidos o-difenólicos protocatecuico, cafeico y clorogénico en presencia de α - y β - ciclodextrina.	45
4.4	Caracterización voltamperométrica de los complejos de inclusión entre los ácidos o-difenólicos y las ciclodextrinas.	49
4.5	Análisis estadístico.	54

4.6	Pruebas de aplicación de β -ciclodextrina en matrices biológicas.	58
5.	Capítulo 5.	
	Conclusiones.	63
6.	Capítulo 6.	
	Perspectivas	65
7.	BIBLIOGRAFÍA	67
	ANEXOS	74

Productos de la Investigación.

Se publicó el artículo:

Macías, N., Aguilar, M., Pérez, S., Hernández, S., Mejía, E., and Evans, D., Extension of electrochemical methods of study of inclusion complexes to the case where the guest molecule undergoes a multielectron, multiproton electrode reaction: Study of phenolic acids forming inclusion complexes with α - and β -cyclodextrins. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011**, 90(1): (33-40).

El trabajo titulado “Caracterización electroquímica y calorimétrica de complejos de inclusión de antioxidantes o-difenólicos naturales con α - y β - ciclodextrinas”, E. Mejía Jácome, M. Aguilar Martínez, S. Pérez Casas, S. G. Hernández Vargas, N. A. Macías Ruvalcaba; fue presentado en cartel en el XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica que se celebró del 30 de mayo al 3 de junio del año 2011 en la Ciudad de México.

Agradecimientos

A la Doctora Martha Aguilar Martínez por todo su apoyo, sus consejos y enseñanzas pero principalmente por haberme invitado a trabajar en el laboratorio de electroquímica molecular en donde aprendí mucho y el cual se convirtió en un lugar tan agradable y familiar que definitivamente voy a extrañar.

A la Doctora Norma Angélica Macías Ruvalcaba por permitirme ser parte de este proyecto de investigación, quien además me instruyó, aconsejó y quien todos los días me compartió de su alegría.

A la Doctora Norma Angélica Macías Ruvalcaba y a la Doctora Silvia Pérez Casas por los datos de las constantes de formación determinadas mediante la técnica de calorimetría.

A la profesora Teresita Flores De Labardini quien es la responsable de que me acercara al mundo de la química.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la U.N.A.M. principalmente al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el sustento otorgado al desarrollo del proyecto (clave: IN-203208).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo a esta investigación a través del proyecto P49796-Q.

A mis papas, Maricruz y Juan Antonio, por su apoyo incondicional, por enseñarme acerca de la vida, por ser quienes me guiaron para llegar a ser como soy y por apoyarme en absolutamente todos los momentos. A ellos les debo todos mis éxitos, gracias por todo su cariño.

A mis hermanos, Rodrigo y Julio, por haberme ayudado a forjar un carácter fuerte, por ser con quienes puedo pelear, reír, llorar y disfrutar cada momento; por ser los responsables de que en mi infancia prefiriera jugar con carritos que con muñecas pero principalmente por ser mis compañeros en esta vida.

A mis abuelos, Julio, Lucelva, Lidia y Clemente; a mis tías, tíos, primas y primos de quienes he aprendido y con quienes he compartido todos mis momentos significativos y quienes no podían faltar en esta dedicatoria.

A mis amigas de toda la vida Deya, Laura, Angie, Mara Christian y Natalia con quienes he disfrutado de la vida y en quienes siempre podré confiar. Para ti, Natalia que no solo eres mi prima, también eres mi hermana, amiga y confidente.

A todos mis amigos de la facultad, Rodrigo, Silvia, Diana, Hugo, Julio, Alma, Jairo, polo, Janina, Héctor, Dieguis, Claudia, Chio, Félix. Bono, Job, Lalo, Mario, etc. con quienes compartí, frustraciones, alegrías, cenas navideñas, fiestas, exámenes profesionales, etc. Quienes le dieron sentido a mi vida en la facultad y de quienes tengo muy buenos recuerdos.

A los pumitas, Montze, Nacho, Emiliano, Luis, Andrea, Laura, Richy, Denis, Abel, Chino, Erik, Mauricio, Pau pau, Fruty, Micky, Maly, Israel, Chucho, Bachita, Antulio, Liz, Miguel, etc. que desde mi primer año en la universidad, cambiaron mi concepto del verano, con quienes disfruté enormemente levantarme muy temprano en vacaciones para ir a “trabajar” al curso, donde me agotaba pero obtenía el valioso premio de una gran satisfacción y mucha vitalidad. Gracias por todos los campamentos y las múltiples reuniones que terminaron siendo una parte fundamental de mi vida.

A mis amigos de la prepa Rosillo (Víctor), Deya, palancas (Adolfo), Sergio, Christian, Dante, Chuy, Tania por todos los buenos momentos y por esas reuniones que me hacen sentir como si no nos dejáramos de ver ni un día.

A todos los que son o fueron parte del laboratorio 4F, Dianita, Memo, Charly, Gerardo, Elizabeth, Mariana, Doc. Manuel pero principalmente a mi amigo Salvador que estuvo conmigo durante toda mi etapa inicial en el laboratorio y quien siempre ha estado dispuesto a ayudarme.

A todas aquellas personas que son importantes para mí, las cuales no se encuentran mencionadas explícitamente aquí, sin embargo, esto no las hace menos importantes.

A la Universidad Nacional Autónoma de México quien no solo me forjó como profesionalista de la química, si no que me enseñó un mundo diferente y me acercó al arte, la ciencia, la recreación y a otras culturas, gracias por haberme hecho parte de esta inigualable comunidad universitaria que siempre será parte de mí.

Glosario

α	coeficiente de transferencia
α -CD	alfa ciclodextrina
β -CD	beta ciclodextrina
γ -CD	gama ciclodextrina
δ -CD	delta ciclodextrina
ΔE_p	delta de la corriente de pico
ε -CD	épsilon ciclodextrina
n	número de moléculas de ciclodextrina
μ L	microlitro
μ m	micrómetro
Å	angstrom
A \cdot	radical libre de antioxidante
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag	plata
AgCl	cloruro de plata
ANOVA	análisis de varianza
°C	grados Celsius
CAF	ácido cafeico
CD	ciclodextrina
CD-G	complejo de inclusión
CGTasa	ciclodextrina glucosil transferasa (enzima)

CHL	ácido clorogénico
CO ₂	dióxido de carbono
Cu	cobre
D	coeficiente de difusión
D _c	coeficiente de difusión del complejo de inclusión
D _f	coeficiente de difusión del compuesto libre
DOPA	dihidroxifenilalanina
E°	potencial redox
ECCE	pasos de reacción: electroquímico, químico, químico, electroquímico
ECEC	pasos de reacción: electroquímico, químico, electroquímico, químico
EROs	especies reactivas de oxígeno
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
E _p	potencial de pico
F _c	F de Fisher calculada
Fe	hierro
F _t	F de Fisher de tablas
G	molécula huésped
g.l	grados de libertad
H ⁺	iones hidrógeno
H ₀	hipótesis nula
H ₁	hipótesis alterna
H ₂ Q	ácido o-difenólico
i _a	corriente anódica

i_c	corriente catódica
K	constante de equilibrio
KCl	cloruro de potasio
K_d	constante de equilibrio de disociación
kDa	kilo Dalton
K_f	constante de equilibrio de formación
k_s	constante heterogénea de transferencia de electrones
mM	milimolar
MC	cuadrado medio
mm de Hg	milímetros de mercurio
n	unidades de oligómeros en la ciclodextrina
N_2	nitrógeno
1O_2	oxígeno singulete
O^{2-}	anión superóxido
O_3	ozono
OH°	radical hidróxido
pH	potencial de hidrógeno
PI	periodo de inducción
pK _a	producto de la constante de acidez
PPO	enzima polifenol oxidasa
Pt	platino
PTC	ácido protocatecuico
Q	quinona

ROOH	hidroperóxido
R^{\cdot} , ROO^{\cdot} , $\cdot OH$, X^{\cdot}	radicales libres
R-H	especie química neutra
RH	ácidos grasos
SC	suma de cuadrados
UV-vis	ultra violeta visible
VC	voltamperometría cíclica
V/s	volts por segundo

Introducción

El color en los alimentos es un factor muy importante, incluso antes de comprarlos y poder probarlos, es la única guía que se tiene para inferir la calidad del producto basándose en experiencias pasadas; el oscurecimiento en frutas, verduras y algunos crustáceos, es un proceso común, puede ser de origen enzimático o no enzimático y se caracteriza por la aparición de colores que van desde amarillentos a café oscuro en la superficie del producto expuesta al ambiente. Esto tiene como resultado una modificación en las características nutricionales y sensoriales, lo que trae como consecuencia que la calidad y vida de anaquel del producto disminuyan. Representa una disminución muy importante para la economía de muchos países en vías de desarrollo al afectar el valor comercial del producto, incluso se estima que más de un 50% de las pérdidas de alimentos frescos se debe al oscurecimiento enzimático.

El oscurecimiento enzimático comienza con la oxidación de diversos sustratos fenólicos (antioxidantes fenólicos) presentes en frutas y verduras principalmente; se lleva a cabo cuando las células que componen al alimento se fracturan ya sea por un cambio brusco de temperatura o por medios mecánicos, lo que lleva a la ruptura de los diversos compartimentos celulares, ocasionando que los compuestos fenólicos se liberen de sus vacuolas y entren en contacto con las enzimas citoplásmicas, las que en presencia del oxígeno del aire inician el proceso de oxidación; las enzimas causantes de catalizar este proceso de oxidación se conocen genéricamente con el nombre de polifenol oxidasas, las cuales intervienen en la síntesis de productos de tipo quinona, que pueden sufrir diversas reacciones y así constituir agregados moleculares de alto peso molecular llamados melaninas, que son los responsables de dicho oscurecimiento.

Las ciclodextrinas (CD) son compuestos oligosacáridos cíclicos de α -D-glucopiranososa, se encuentran unidas por enlaces de tipo α -(1-4), las más comunes son los tipos α -, β - y γ -, que son los oligómeros de 6, 7 y 8 unidades respectivamente; tienen la apariencia de conos truncados donde la superficie externa es de carácter hidrofílico, mientras que el interior de estas cavidades es de carácter hidrofóbico. Algunos estudios indican que las ciclodextrinas son capaces de inhibir el pardeamiento enzimático, lo cual se atribuye a la formación de complejos de inclusión entre compuestos fenólicos naturales y las ciclodextrinas, el fenómeno consiste básicamente en la sustitución de las moléculas de disolvente que se encuentran dentro de su cavidad, por un huésped menos polar (por ejemplo los antioxidantes fenólicos) creándose de esta manera una interacción no covalente entre el huésped y la ciclodextrina.

En el presente proyecto se estudió sistemáticamente el proceso de formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y algunos de los *o*-hidroxifenoles naturales más abundantes en frutas y verduras que sirven como sustratos para la polifenol oxidasa, se consideró que los compuestos *o*-difenílicos son compuestos electroquímicamente activos, los cuales en medio ácido se oxidan a la correspondiente *o*-quinona. Se utilizaron las técnicas de voltamperometría cíclica y simulación digital como herramientas básicas para caracterizar el fenómeno de inclusión, el cual es de gran relevancia, pues es posible proponer que, si las *o*-quinonas forman complejos de inclusión estables con las ciclodextrinas, esto ayudaría a prevenir las reacciones posteriores de las quinonas con los aminoácidos y otros componentes celulares nucleofílicos, que son los responsables de los pigmentos cafés en frutas y vegetales frescos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Reacciones de óxido-reducción

Los equilibrios de óxido-reducción se producen cuando un átomo o un grupo de átomos toman o ceden electrones, lo que puede o no incluir la adición de átomos de oxígeno o la pérdida de átomos de hidrógeno de la sustancia que se está oxidando, de forma simultánea se produce la correspondiente reacción que implica la captación de los electrones por otro átomo diferente o grupo de átomos.¹

En el conjunto de reacciones metabólicas que se producen en los seres vivos se pueden distinguir dos grandes grupos, reacciones de anabolismo o síntesis, consistentes en la formación de grandes moléculas a partir de otras más pequeñas, y reacciones de catabolismo, en las que se verifica el proceso inverso. Se puede decir que tanto unas como otras se producen a base de oxidaciones y reducciones sucesivas de manera encadenada.² Dentro de los sistemas biológicos estas reacciones de óxido-reducción ayudan a mantener el equilibrio en diversos procesos celulares entre los que se encuentra la transducción de señales, la expresión génica y la proliferación celular. Las reacciones de óxido-reducción son un reflejo del balance entre los antioxidantes de la célula o de los obtenidos en la dieta y los oxidantes producidos durante el metabolismo celular o aquellos producidos debido a la exposición del organismo a agentes ambientales. Es por esto que cuando se pierde el equilibrio de dichas reacciones, también se pierde el control de los procesos celulares.³ A pesar de que las reacciones de óxido-reducción son comunes en los sistemas biológicos, en el caso particular de los alimentos, la mayoría de las veces el proceso de oxidación es poco deseable ya que provoca una modificación en las características nutricionales y sensoriales de los alimentos, lo que trae como consecuencia que la calidad y vida de anaquel del producto disminuya. Esto es debido a que ciertos compuestos químicos tales como las vitaminas, lípidos y pigmentos presentes en los alimentos, pierden valor al sufrir procesos

de oxidación. A partir de este momento se hará referencia únicamente a las reacciones de oxidación ya que son las que básicamente producen alteraciones en los alimentos.

1.2 Radicales libres

Los radicales libres son cualquier especie capaz de existir de manera independiente con uno o más electrones desapareados, debido a esto, son altamente reactivos; tienen un tiempo corto de vida media y pueden comportarse como donador o aceptor de electrones. Los radicales libres pueden estar cargados positiva o negativamente, cationes radicales o aniones radicales, respectivamente, o ser eléctricamente neutros. Los radicales tienen la capacidad de reaccionar con moléculas no radicales para dar origen a un nuevo radical; son producidos por procesos fisiológicos celulares y también por exposición a algún agente ambiental.³

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son ejemplo de radicales libres; su producción dentro del organismo es parte de diversos procesos fisiológicos naturales, sin embargo cuando éstas se encuentran en exceso pueden dañar al organismo.⁴ Son las responsables de una gran cantidad de reacciones de oxidación en los sistemas biológicos y provocan la pérdida del control en el balance oxidativo, el cual está relacionado al uso de oxígeno molecular por la célula.

Es inevitable la generación de especies reactivas debido a que tienen funciones biológicas, sin embargo, es importante contar con suficientes antioxidantes y enzimas para prevenir o limitar el daño que estas especies pueden generar dentro del organismo. Tales⁵ como el ataque directo a las bases nitrogenadas que forman el ADN, lo que puede desencadenar diversas mutaciones y carcinogénesis,⁶ la reacción con los aminoácidos que conforman a las proteínas y la ruptura de los enlaces peptídicos. Además, la agregación de

las proteínas favorece la peroxidación lipídica. Este último es el proceso que se lleva a cabo con mayor facilidad debido al elevado número de lípidos presentes en los organismos vivos y también en una gran variedad de productos alimenticios de interés industrial y comercial.⁷ Dentro de las especies reactivas de oxígeno más abundantes y nocivas se encuentran las especies radicales y no radicales que se producen por la reducción del oxígeno molecular dando especies como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); también especies derivadas del nitrógeno como el óxido nítrico (NO) e incluso especies de cloro.^{8,9,10}

1.3 Oxígeno

Fue descubierto en 1774 por Joseph Priestley, más tarde Lavoisier le dio el nombre de “oxígeno” que significa formador de ácido, se encuentra combinado con otros elementos en una gran variedad de compuestos.

El oxígeno es el elemento más abundante en términos de masa tanto en la corteza terrestre como en el cuerpo humano, es un no metal. En la naturaleza se encuentra con dos o más átomos del mismo tipo enlazados entre sí. Cuenta con dos alótropos que son O_2 y ozono O_3 . El O_3 es un gas tóxico con fuerte olor acre mientras que el O_2 es una molécula indispensable para la vida y el agente oxidante en el metabolismo de nuestro organismo y alimentos. A temperatura ambiente el O_2 se encuentra como gas inodoro e incoloro, cambia a estado líquido a -183°C y se congela a -283°C ; es ligeramente soluble en agua, y su presencia en ella es indispensable para la vida marina.

Cada átomo de oxígeno está unido por dos electrones formando un enlace covalente cuya entalpía de enlace es de 495 kJ/mol, tiene dos pares de electrones desapareados, puede completar su octeto ya sea tomando dos electrones para formar el anión superóxido (O_2^-) o

bien compartiendo dos electrones, de esta manera tiene la capacidad de oxidar otras moléculas. Puede también formar enlaces con muchos otros elementos, dando lugar a compuestos oxigenados los cuales son termodinámicamente más estables que el O_2 .

El oxígeno en su estado basal se encuentra como triplete, esto es, posee spines no apareados, por otra parte el fenómeno de transferencia de energía asociado a las reacciones químicas puede lograr la inversión del spin dando la producción de oxígeno singlete (1O_2).¹¹

1.4 Degradación Lipídica

Los lípidos consisten en un amplio grupo de compuestos, en general, son solubles en disolventes orgánicos y escasamente solubles en agua. Los ésteres del glicerol de los ácidos grasos representan el 99% de los lípidos de origen animal y vegetal que además son los componentes de los alimentos más susceptibles a la alteración por oxidación;¹² los más representativos de este grupo son los mono, di o triglicéridos, según el grado de esterificación.¹³ Los lípidos tienen diversas funciones biológicas, ya que son los principales componentes del tejido adiposo y junto con las proteínas y los hidratos de carbono constituyen la mayor parte de los componentes estructurales de las células, donde se encuentran en forma de fosfolípidos y esteroides. Los lípidos actúan como cofactores de diversas enzimas, acarreadores de electrones, pigmentos receptores de luz, agentes emulsificantes, hormonas y mensajeros intracelulares, son fuente de almacenamiento de energía y son esenciales cuando las reservas de hidratos de carbono se agotan. Se encuentran de manera abundante en el organismo por lo que son susceptibles a la descomposición oxidativa por las especies reactivas de oxígeno.^{14,15}

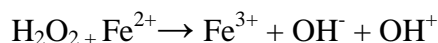
La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de los alimentos, da lugar a la aparición de sabores y olores desagradables que se conoce como enranciamiento. Esto hace que los productos sean inaceptables para el consumidor o reduzcan su vida útil, lo que ha generado un gran interés en la industria alimentaria para evitar este deterioro.¹⁵

La oxidación lipídica se lleva a cabo por cuatro mecanismos principales:

- Autooxidación.
- Fotooxidación.
- Reacciones asociadas a la lipooxigenasa.
- Oxidación lipídica catalizada por metales

Sólo las dos primeras son directamente iniciadas por alguna de las formas del oxígeno y la tercera es de carácter enzimático. Sin embargo, las tres comparten el hecho de que el grado de oxidación de los lípidos de un producto alimenticio puede incrementarse dependiendo de la cantidad de especies reactivas de oxígeno que se encuentren presentes en el medio.^{16,17}

Dentro de la oxidación lipídica catalizada por metales se pueden encontrar la autooxidación y la fotooxidación ya que ambas pueden ser catalizadas por metales, por ejemplo, el radical hidroxilo, que es un iniciador en el proceso de oxidación, puede formarse por reacciones tipo Fenton:

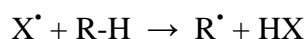


Se cree que la autooxidación es la principal reacción implicada en el deterioro producido por la oxidación de los lípidos, se lleva a cabo por mecanismos típicos de radicales libres, lo que se demuestra porque:

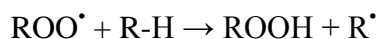
- Presentan una marcada inhibición por especies químicas que se sabe interfieren con otras reacciones de radicales libres.
- Son catalizadas por la luz y por sustancias capaces de producir radicales libres.
- Se da una alta producción de hidroperóxido, ROOH.
- Se obtienen rendimientos cuánticos superiores a la unidad cuando las reacciones de oxidación se inician por la luz.
- Existe un periodo de inducción relativamente largo cuando se inician con el sustrato puro.¹⁵

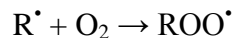
La autooxidación presenta un periodo de inducción, que es el intervalo de tiempo en el que no se presentan cambios detectables en los lípidos en cuanto a su estado de oxidación. La duración de este período es muy sensible a varios componentes presentes que pueden actuar como pro-oxidantes, incrementando la velocidad de la reacción de oxidación, o como antioxidantes que reducen la velocidad de estos procesos. Al término de este periodo se da el mecanismo vía radicales libres, el cual se lleva a cabo mediante tres etapas que son iniciación, propagación y terminación.

En la iniciación se da la sustracción de un átomo de hidrógeno por una especie radical, produciendo un radical lipídico R^\bullet , capaz de reaccionar con O_2 para formar un radical peróxido lipídico.

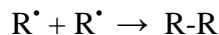
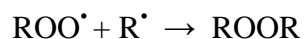
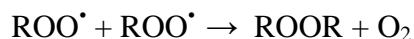


En la propagación el peróxido lipídico, ROO^\bullet , reacciona con otras moléculas del lípido, generando nuevos radicales libres R^\bullet que reaccionan con oxígeno.





Finalmente, cuando la concentración de lípidos disminuye debido a la descomposición, es factible que dos especies radicales reaccionen para formar especies neutras con propiedades químicas distintas a los compuestos de origen. A este tipo de reacciones se les conoce como reacciones de terminación y son las que tienen una importancia relevante, ya que los productos de dichas reacciones son los responsables del deterioro en el sabor y valor nutricional del alimento.



A pesar de conocer el proceso por el cual se da el mecanismo de autooxidación es difícil explicar el origen de los primeros radicales libres necesarios para iniciar el proceso. Es poco probable que sea mediante un ataque directo del oxígeno en su forma más estable (triplete) a los dobles enlaces de los ácidos grasos, por que la reacción no obedecería a la ley de conservación del spin. La explicación más satisfactoria es la que indica que el oxígeno singulete (1O_2), una especie activa en el deterioro fotooxidativo, es la responsable de la iniciación; ya que sus dos electrones se encuentran con spines opuestos, en un estado de mayor energía, dando lugar a un estado excitado. El oxígeno en el estado singulete es más electrofílico que el oxígeno en el estado triplete, por tanto, puede reaccionar más rápidamente.^{9,15}

1.5 Oxidación de fenoles

La oxidación de estos compuestos es peculiar debido a que no tienen un hidrógeno en el carbono que lleva al hidroxilo, en su lugar, la reacción de un fenol con alguno de los varios agentes oxidantes produce una 2,5-ciclohexadieno-1,4-diona o quinona; la reacción tiene lugar a través de un mecanismo de radicales libres.¹⁸

En general, la reacción de oxidación comienza por la formación de una hidroquinona a partir de un compuesto fenólico la cual se oxida fácilmente debido al par de átomos de oxígeno enlazados al anillo para obtener la quinona correspondiente.¹²

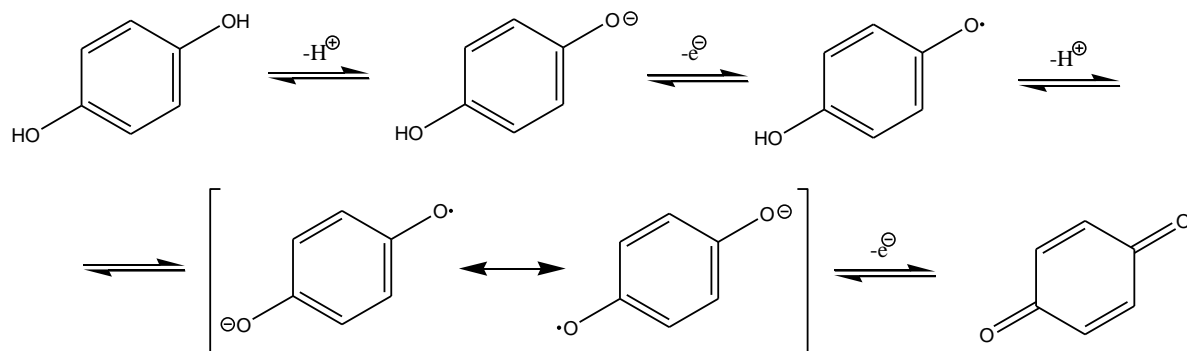


Figura 1. Reacción de oxidación de hidroquinona a su correspondiente quinona.

Las quinonas son una interesante clase de compuestos debido a sus propiedades de óxido-reducción; se reducen con facilidad en hidroquinonas las cuales se re-oxidan fácilmente a quinonas.¹⁹

En presencia de aire muchos fenoles se autooxidan formando dichas quinonas de color oscuro, suele ser una reacción común que presentan los tejidos vegetales como resultado de una fractura en su estructura, la cual se manifiesta por un oscurecimiento del tejido.¹⁹

1.6 Conceptos básicos de los antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que por separado o mezclada es capaz de aplazar, retardar o prevenir el periodo de oxidación de las biomoléculas constituyentes de un alimento u organismo provocados por la acción del aire, luz o trazas de iones metálicos. En términos de alimentos los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, sin embargo, lo hacen a costa de inactivarse por lo que su utilización retrasa la alteración oxidativa del alimento pero no la evita de forma definitiva.¹⁶ Su mecanismo de acción se da retardando la iniciación o interrumpiendo la propagación de la cadena de radicales libres.^[15]

Los antioxidantes muestran diferente grado de eficiencia en la protección de un alimento, el cual está relacionado con varios factores, como son la energía de activación, la constante de velocidad, su potencial de óxido-reducción y su solubilidad.¹⁵

Existen diversas clasificaciones, una de ellas los cataloga como antioxidantes naturales o sintéticos, dentro de los primeros se encuentran todos aquellos que se extraen de fuentes naturales los cuales se consideran totalmente inocuos debido a que los hemos venido consumiendo en la dieta desde hace miles de años. El butilhidroxianisol (BHA), el galato de propilo (PG), el butilhidroxitolueno (BHT) y el di-t-butilhidroquinona (TBHQ) son ejemplos de antioxidantes sintéticos, los cuales son ampliamente usados en alimentos ricos en lípidos.¹⁴

También se clasifican como antioxidantes primarios, secundarios y compuestos sinergistas.

Los antioxidantes primarios se encargan de donar átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres generados por las especies reactivas de oxígeno o por la peroxidación lipídica, convirtiéndolos en productos más estables, interrumpiendo la propagación de las

reacciones en cadena. Muchos de los antioxidantes naturales o sintéticos que presentan la funcionalidad fenol en alguna parte de su estructura, entran en esta definición de antioxidantes primarios, debido a su gran habilidad como atrapadores de radicales libres.

En su mecanismo de acción los antioxidantes primarios pueden inhibir la fase de iniciación de la peroxidación lipídica al reaccionar con un radical alquilo, o bien pueden inhibir los pasos de propagación al reaccionar con un radical peróxido lipídico o con un radical alcoholesilo. Adicionalmente, los radicales libres del antioxidante pueden interferir con los pasos de propagación formando compuestos estables.

Los antioxidantes secundarios, son sustancias que por reducción y/o donación de hidrógeno descomponen a los hidroperóxidos, formando productos estables como los alcoholes. En general todos los compuestos de azufre como los tioles, los sulfuros y disulfuros son inhibidores activos de la autooxidación.^{6,7,20}

El fenómeno de sinergismo se produce cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad más pronunciada que la suma de las actividades de los antioxidantes individuales utilizados por separado.^{15,16}

Los compuestos sinergistas se dividen en dos amplias categorías, la primera de ellas la forman los compuestos con propiedades quelantes y el segundo grupo lo forman los compuestos capaces de aceptar radicales libres. La acción de los sinergistas es de vital importancia ya que en muchos casos ayudan a la regeneración efectiva del antioxidante primario, regresándolo a su forma reducida; si bien los agentes quelantes no actúan como antioxidantes, atrapando radicales libres, su función es interferir con los metales prooxidantes como cobre y hierro que aunque están presentes en cantidades traza, resultan ser excelentes formadores de radicales libres. Entre los agentes quelantes más utilizados se

encuentran el ácido etiléndiaminotetraacético, el ácido cítrico, los aminoácidos y los fosfatos.

El ácido ascórbico, el palmitato de ascorbilo, el ácido tartárico y los sulfitos, son compuestos capaces de reaccionar con el oxígeno libre y mantenerlo alejado del sistema.^{6,7,21}

1.6.1 Antioxidantes naturales presentes en alimentos.

El desarrollo de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, cáncer, hipertensión y diabetes tipo dos, involucran una gran producción de radicales libres asociados al estrés oxidativo. Una dieta rica en frutas y vegetales se asocia con un bajo riesgo de desarrollar dichas enfermedades crónicas debido a su contenido de vitaminas, minerales y compuestos con efectos protectores, en particular, los antioxidantes. Los factores propios de la planta como su genética, las condiciones de cultivo y los factores externos como la composición del suelo, las condiciones de crecimiento, estado de madurez y las condiciones posteriores a la cosecha, les confiere una mayor ó menor capacidad antioxidante debido a que puede inducir en mayor o menor grado, la síntesis de compuestos secundarios como los polifenoles.

Los antioxidantes llamados polifenoles se consideran metabolitos secundarios. Representan la principal defensa antioxidante no enzimática frente a las especies reactivas de oxígeno ya que son los compuestos bioactivos más abundantes en los alimentos. Se encuentran en frutas, verduras, cereales y leguminosas, por lo que su consumo promedio en la dieta alcanza valores de 1g/día, lo que es más de diez veces la ingesta requerida de vitamina C.

La alta capacidad antioxidante de los polifenoles es de vital importancia para la planta ya que es su mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés como cambios de temperatura, exposición a radiación ultra violeta y ataque de patógenos²¹

Los compuestos fenólicos naturales de mayor abundancia son los tocoferoles, los derivados de los flavonoides y los derivados de los ácidos benzoico y cinámico tales como el ácido caféico, clorogénico, ferúlico, cumárico y protocatecuico.²²

Tabla 1. Principales sustratos fenólicos presentes en frutas y verduras. ²³	
Fuente	Sustrato polifenólico
Manzana	Ácido clorogénico (pulpa), catecol (cáscara), catequin, ácido cafeico, 3,4-dihidroxyfenilalanina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ρ -cresol, 4-metil catecol, leucocianidina, ácido p -cumárico, glucósidos de flavonoles
Albaricoque	Ácido isoclorogénico, ácido cafeico, 4-metil catecol, ácido clorogénico, catequin, epicatequin, pirogallol, catecol, flavonoides, derivados del ácido p -cumárico.
Aguacate	4-metil catecol, dopamina, pirogalol, catecol, ácido clorogénico, ácido cafeico, 3,4-dihidroxyfenilalanina.
Plátano	2,4-dihidroxifeniletilamina (dopamina) leucodelphinidina, leucocianidina.
Cacao	Catequin, leucoantocianidinas, ancianidinas, complejos de taninos.
Granos de café	Ácido clorogénico, ácido cafeico
Berenjena	Ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico, derivados del ácido cinámico.
Uva	Catequin, ácido clorogénico, catecol, ácido cafeico, 3,4-dihidroxyfenilalanina, taninos, flovonoles, ácido protocatecuico, resorcinol, hidroquinona, fenol.
Lechuga	Tirosina, ácido cafeico, derivados del ácido clorogénico
Langosta	Tirosina
Mango	Dopamina-HCl, 4-metil catecol, ácido cafeico, catecol, ácido clorogénico, tirosina, 3,4-dihidroxyfenilalanina, ρ .cresol.
Champiñón	Tirosina, catecol, 3,4-dihidroxyfenilalanina, dopamina, adrenalina, noradrenalina.
Durazno	Ácido clorogénico, pirogalol, 4-metil catecol, catecol, ácido cafeico, ácido gálico, catequina, dopamina.
Pera	Ácido clorogénico, catecol, catequina, ácido cafeico, 3,4-dihidroxyfenilalanina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ρ -cresol.
Ciruela	Ácido clorogénico, catequina, ácido cafeico, catecol, 3,4-dihidroxyfenilalanina.
Papa	Ácido clorogénico, ácido cafeico, catecol, 3,4-dihidroxyfenilalanina, ρ -cresol, ácido hidroxyfenil propiónico, m -cresol.
Camarón	Tirosina
Camote	Ácido clorogénico, ácido cafeico, cafeilamida
Té	Flavonoles, catequinas, taninos, derivados del ácido cinámico

1.7 Derivados *o*-difenólicos de los ácidos benzoico y cinámico

Estos compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas ya que contribuyen en procesos vitales, tales como la formación de las paredes celulares y como precursores sintéticos de los flavonoides.^{20,22}

Tabla 2: Principales compuestos derivados del ácido benzoico y cinámico

Derivados del ácido benzoico	Derivados del ácido cinámico
Protocatecuico	Ácido cumárico
Ácido siríngico	Ácido cafeico
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Ácido clorogénico
Ácido vinílico	Ácido ferúlico
	Ácido sináptico
	Ácido rosmarínico

Con respecto a su capacidad antioxidante, los derivados del ácido cinámico presentan mayor actividad que los derivados del ácido benzoico y son por mucho la clase de antioxidantes más comunes en las plantas,^{14, 24} en especial el ácido cafeico y el ácido clorogénico los que tienen entre sus funciones la regeneración de tocoferoles.

El ácido clorogénico es el compuesto que se encuentra con mayor recurrencia en una amplia gama de vegetales^{22,25} como en los frijoles, papas, manzanas, en las hojas de tabaco, cebollas²⁶ y en otros productos como los vinos, que resultan ser fuentes ricas de este tipo de moléculas antioxidantes.²⁷ En general los antioxidantes fenólicos se encuentra en la mayor parte de las especias que se usan para sazonar los alimentos como es el comino, el anís, el laurel y la canela.^{6,27 27} Los compuestos fenólicos simples son capaces de regenerar

los tocoferoles consumidos en los diversos procesos oxidativos del organismo, por reducción del radical tocoferilo, en presencia del ácido ascórbico.^{6, 28}

Los compuestos fenólicos en presencia de metales de transición como el Fe^{3+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} pueden actuar como ligantes, inhibiendo los procesos de formación de radicales $\bullet OH$, por medio de reacciones tipo Fenton.

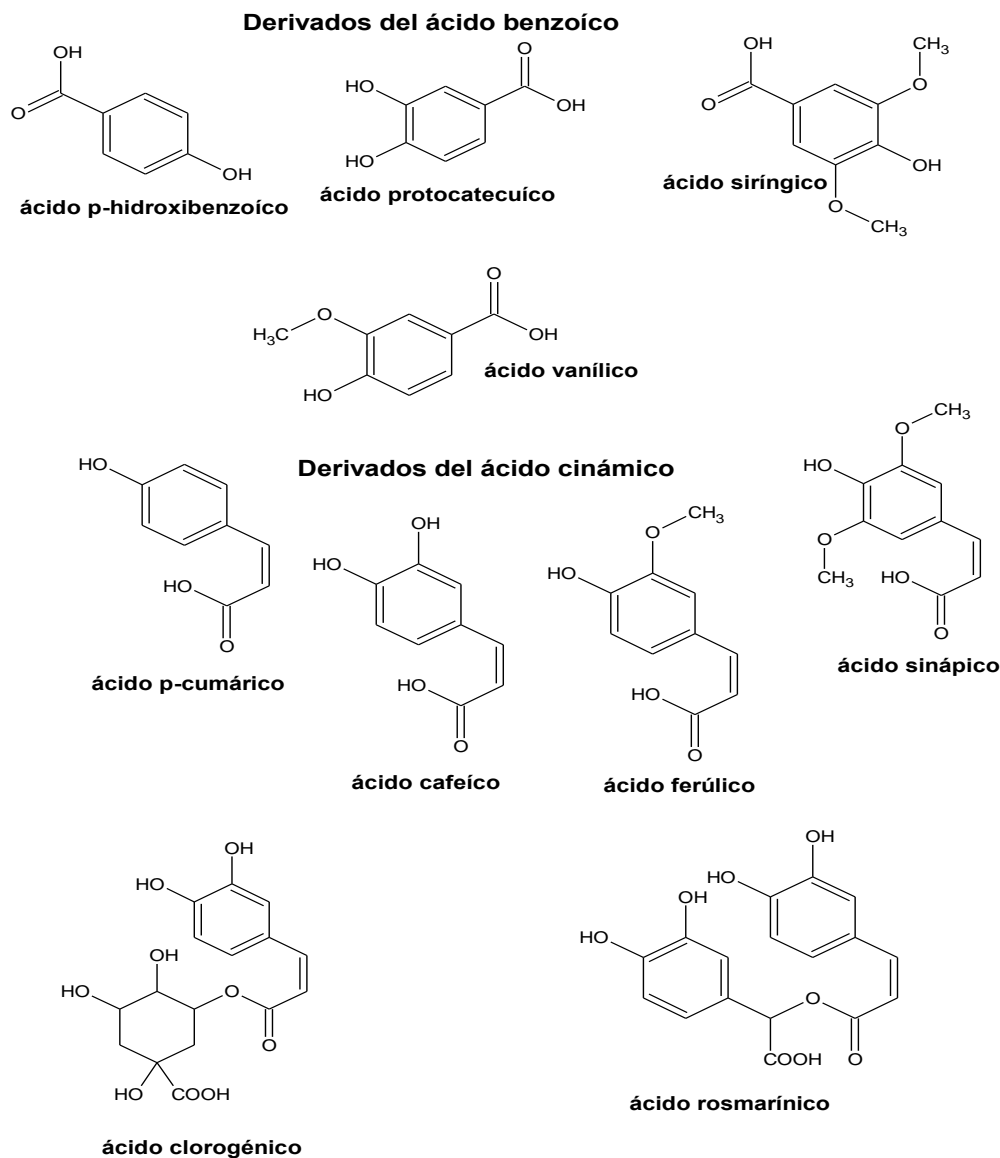


Figura 2. Compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico.²⁹

Los compuestos fenólicos previenen los procesos de iniciación de la peroxidación lipídica ya que pueden reaccionar directamente con los radicales formados durante ésta, tanto en la fase de iniciación como en la de propagación o con las especies reactivas de oxígeno, con lo que cumplen la función de antioxidantes primarios.³⁰ La importancia de los compuestos fenólicos como agentes antioxidantes es vital para la defensa del organismo contra las especies reactivas de oxígeno, sin embargo, la abundancia de este tipo de compuestos, hace que el producto alimenticio sea susceptible a un proceso de deterioro adicional a la peroxidación lipídica y que suele ser igual de destructiva con las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, este otro proceso se conoce como oscurecimiento enzimático, en el que los compuestos fenólicos, son precisamente los sustratos del proceso de deterioro enzimático.³⁰

1.8 Oscurecimiento en productos alimenticios.

El color en los alimentos es un factor muy importante, incluso antes de comprarlos y poder probarlos, genera una expectativa de lo que se puede esperar, ya que es la única guía que se tiene para inferir la calidad de los productos basándose en experiencias pasadas. Desde que la preservación y el procesamiento de los alimentos pasaron de la cocina tradicional a la industria de alimentos se ha mantenido el deseo y la búsqueda por preservar, una vez que el alimento ha sido procesado, el color lo más cercano al real. El oscurecimiento en frutas, verduras y algunos crustáceos es un proceso común, que puede ser de origen enzimático o no enzimático y se caracteriza por la aparición de colores que van desde amarillentos hasta café oscuro en la superficie del producto expuesta al ambiente.^{31,31} El oscurecimiento tiene como resultado una modificación en las características sensoriales y como consecuencia la calidad y vida de anaquel del producto

disminuye.³⁰ Si bien en algunos productos como las hojas del tabaco o de té, éste no es un proceso indeseable, en la mayoría de los casos se convierte en algo desfavorable ya que afecta en gran medida el valor comercial del producto.²²

La práctica más utilizada para prevenir el oscurecimiento en alimentos es el tratamiento térmico (escaldado), como parte del procesamiento, sin embargo, produce diversas modificaciones químicas algunas de las cuáles repercuten en descomposición y que también pueden interaccionar entre sí de manera compleja para generar nuevos compuestos.¹⁵ Además de esto, existen algunas frutas que no pueden ser escaldadas debido a su delicado tejido que puede romperse durante el proceso, es por esto que se buscan alternativas para prevenir el oscurecimiento oxidativo que ocurre principalmente durante las operaciones de cortado o pelado. Actualmente en lugar de escaldar se utiliza tratamiento con sulfito o la acidificación de las frutas, el uso del primero de ellos debe ser muy cuidadoso por que presenta problemas de toxicidad, mientras que el otro método modifica el sabor de los alimentos.²⁸

También se utilizan técnicas de procesamiento o empaque que excluyen al oxígeno o incorporan sustancias químicas apropiadas para evitar las reacciones de oxidación.¹⁵

1.8.1 Oscurecimiento enzimático

Este tipo de oscurecimiento se lleva a cabo cuando las células que componen al alimento se fracturan ya sea por un cambio brusco de temperatura (como ocurre con los alimentos congelados) o por medios mecánicos (como la agitación o el corte con algún instrumento). Éstos llevan a la ruptura de los diversos compartimentos celulares ocasionando que los compuestos fenólicos se liberen de sus vacuolas y entren en contacto con las enzimas citoplásmicas, las que en presencia de oxígeno del aire inician el proceso

de oxidación. Las enzimas causantes de catalizar este proceso de oxidación se conocen genéricamente con el nombre de polifenol oxidasas. Se encuentran generalmente en los cloroplastos y en algunos casos presentan formas solubles en el citoplasma, su tamaño varía de 57 a 62 kDa.^{30,31,33}

1.8.2 Métodos empleados contra el oscurecimiento enzimático.

Para evitar los efectos indeseables del oscurecimiento enzimático se han desarrollado gran cantidad de procedimientos, los cuales se dividen en tres grupos:

- a) Métodos de protección físicos.
- b) Métodos de protección contra el oxígeno.
- c) Métodos químicos.

Los métodos de protección físicos se basan en cambios en la temperatura del producto, principalmente se aplica el tratamiento térmico ya que inhibe la actividad enzimática de la polifenol oxidasa, muy a menudo se usa en hongos y en rebanadas de manzana y pera.

El fundamento de los métodos de protección contra el oxígeno es mantener lo más alejado posible al oxígeno del producto alimenticio y con ello evitar que actúe como cofactor de las enzimas polifenol oxidasa. Esto se logra realizando un cerrado hermético o con atmósferas modificadas en los empaques, como es el caso de atmósferas de CO₂ ó N₂, donde este último ha resultado ser más efectivo debido a que conserva mejor el sabor y aroma de los productos. Se ha observado que una presión de aproximadamente 380 mm de Hg es suficiente para mantener a la mayoría de los alimentos en buen estado. La utilización de presiones demasiado bajas afecta la textura y la apariencia de los alimentos.

Los métodos químicos generalmente son costosos, la mayoría no se consideran inocuos, además, suelen alterar las propiedades organolépticas de los alimentos. Se clasifican de

acuerdo con su modo de acción primario en compuestos reductores, agentes quelantes, agentes acidulantes, compuestos inhibidores de la polifenol oxidasa, tratamientos enzimáticos y formación de complejos con los sustratos de la polifenol oxidasa.^{15, 32, 33}

1.9 Polifenol Oxidasa

Son un grupo de enzimas que contienen en su centro activo dos átomos de cobre unido cada uno a tres residuos de histidina, catalizan la oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular, los cuales son los responsables del oscurecimiento enzimático que ocurre durante la recolección, manejo, procesamiento y/o almacenamiento de muchos vegetales.

Existen tres tipos de enzimas polifenol oxidasas, las cuales poseen diferentes actividades relacionadas entre sí. La primera es la catecol oxidasa u *o*-difenoil oxígeno-oxidoreductasa; lacasa o *p*-difenoil: oxígeno-oxidoreductasa y por último, la cresolasa o monofenol monooxigenasa. La primera de ellas cataliza dos tipos de reacciones (Figura 2): la hidroxilación de monofenoles para dar *o*-hidroxifenoles (actividad cresolasa) y la oxidación de estos compuestos a *o*-quinonas; la segunda cataliza la reacción de oxidación tanto de *o*-hidroxifenoles como de *p*-hidroxifenoles a sus respectivas quinonas y la última de ellas cataliza la reacción de hidroxilación de monofenoles.³⁵

La polifenol oxidasa y los fenoles son directamente responsables de algunos de los pardeamientos enzimáticos en frutas y hortalizas, se ha informado que sus niveles pueden cambiar durante el desarrollo del fruto y maduración que puede influir en la posibilidad de daños en la fruta.³⁴

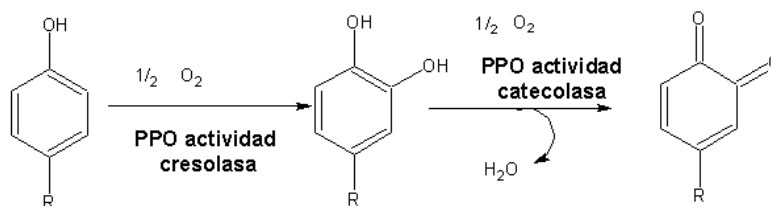


Figura 3. Reacciones de oxidación de sustratos fenólicos por la PPO.^[31]

El pH óptimo de estas enzimas es variable y se encuentra en el intervalo de 4 a 7 dependiendo de la fuente de donde se obtiene la enzima y de la proporción de isoenzimas. Las polifenol oxidasas son sensibles al calor, ya que a temperaturas mayores a 70 °C se inactivan y muestran su mayor resistencia al calentamiento alrededor de pH = 6, por lo que el calentamiento acompañado de valores inferiores de pH, suele ser efectivo en su inactivación.

Entre la amplia cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran en frutas y verduras, sólo los monofenoles o difenoles sirven como sustratos directos de la polifenol oxidasa. Se cree que en este tipo de reacciones catalizadas por la polifenol oxidasa el oxígeno se une primero a la enzima.

Los derivados del ácido cafeico y de los 3-flavonoles son comúnmente los mejores sustratos. Otras clases de compuestos fenólicos como son las flavonas y taninos son sustratos de carácter débil, debido probablemente al impedimento estérico ocasionado por el tamaño propio de estos compuestos y de sus diversos sustituyentes; si bien esta clase de compuestos no son sustratos directos pueden causar gran parte de este oscurecimiento actuando en reacciones de oxidación acopladas.³¹

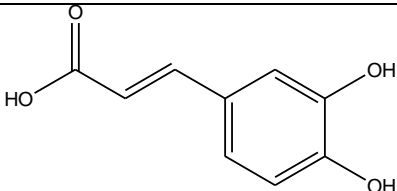
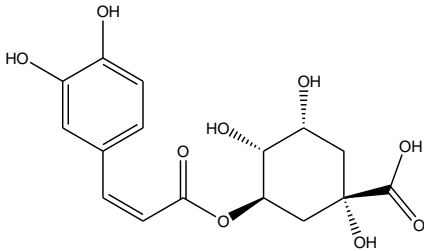
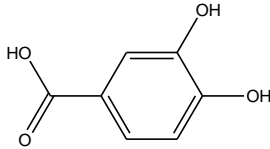
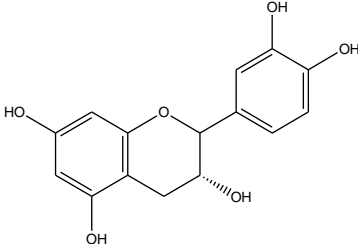
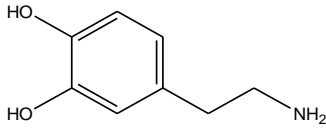
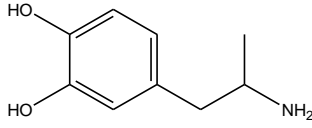
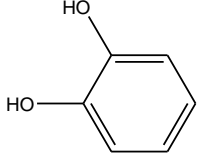
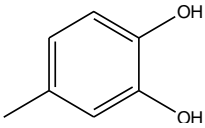
Sustrato	Estructura
Ácido cafeico	
Ácido clorogénico	
Ácido protocatecuico	
Catequina	
Dopamina	
L-DOPA	
Pirocatecol	
4-metil catecol	

Figura 4. Principales sustratos de la polifenol oxidasa. ^{35,36,37}

Las quinonas provenientes de la reacción enzimática de las polifenol oxidasas son muy reactivas y pueden formar una gran cantidad de compuestos coloridos por medio de sus reacciones con otros componentes nucleofílicos presentes en el medio celular. Lo que produce compuestos de alto peso molecular, conocidos como melaninas que son los compuestos que imparten la coloración amarillo-café al alimento.

1.10 Aspectos generales de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas también llamadas cicloamilosas, ciclomaltosas o dextrinas de Schardinger en honor a su descubridor, son compuestos oligosacáridos cíclicos de α -D-glucopiranososa se encuentran unidas por enlaces de tipo α -(1-4). Las más comunes son los tipos α -, β - y γ -, que son los oligómeros de 6, 7 y 8 unidades respectivamente, también existen de tamaños mayores como la δ -CD y la ϵ -CD, sin embargo, éstas carecen de importancia.^{38,39,40}

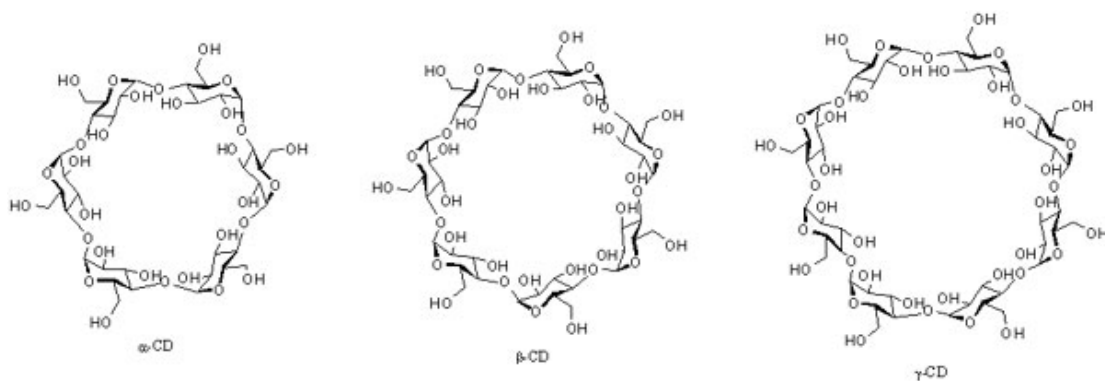


Figura 5. Estructura de las α -, β - y γ -ciclodextrinas.⁴⁰

Se obtienen a partir del almidón gracias a la acción de la enzima ciclodextrina glicosil transferasa (CGTasa), que es producida por el microorganismo *Bacillus macerans*,

el cual degrada la fracción amilasa hidrolizando la hélice y enlazando los extremos, formando de esta manera oligosacáridos cíclicos.⁴¹

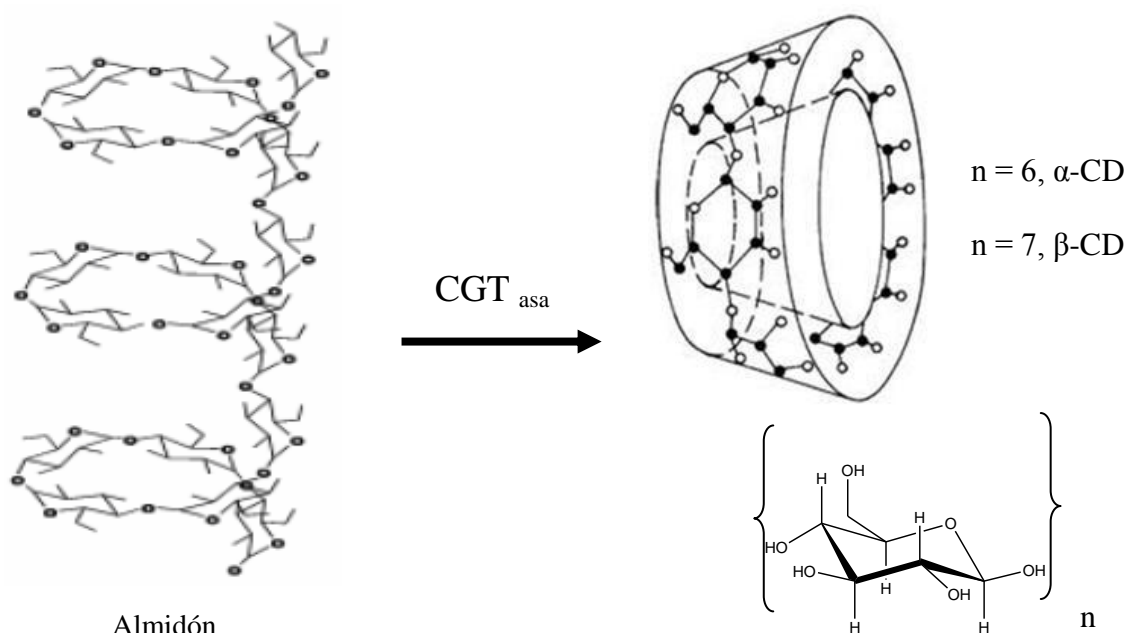


Figura 6. Degradación del almidón y formación de ciclodextrinas.⁴¹

Estructuralmente, debido a la falta de rotación entre los enlaces que unen a las unidades de glucopiranosas, las ciclodextrinas tienen la apariencia de conos truncados (Figura 6), donde la superficie externa es de carácter hidrofílico, debido a que los grupos hidroxilo que conforman a las glucopiranosas se encuentran dispuestos al exterior. Mientras que el interior de estas cavidades es de carácter hidrofóbico⁴¹ debido a la presencia de hidrógenos provenientes de los grupos C₃-H, C₅-H y metileno, además del oxígeno. Esto les permite la inclusión en su interior de compuestos orgánicos apolares o parcialmente

polares, como es el caso de los derivados del ácido cinámico⁴² y muchos otros compuestos orgánicos.

Su tamaño es muy importante, han sido estudiadas como moléculas anfitrionas o acarreadoras, se ha determinado que si son muy pequeñas como la α -ciclodextrina, algunas moléculas huésped no podrán ser incluidas y al ser muy grandes podrá albergar a más de una, lo que provoca una disminución en la estabilidad del complejo de inclusión.

1.10.1 Propiedades Fisicoquímicas de las ciclodextrina.

Físicamente las tres principales ciclodextrinas son compuestos en forma de un polvo blanco e higroscópico, sus puntos de fusión se encuentran entre 240°C y 250°C, lo que se debe a su estable red estructural.⁴¹ Son altamente solubles en agua, a excepción de la β -ciclodextrina que posee una solubilidad menor a la de sus análogos de 6 y 8 unidades, debido a la presencia de grupos (OH) presentes en los carbonos C₂, C₃ y C₆ los cuales forman enlaces de hidrógeno con el agua. Sin embargo, los grupos (OH) presentes en el C₂ también pueden enlazarse con los OH del C₃ de la unidad de glucopiranososa adyacente, formando un cinturón de enlaces de hidrógeno intramolecular.^{43,44} Debido a que la β -ciclodextrina se compone de siete unidades de glucopiranososa es menos simétrica con respecto a las α - y γ - ciclodextrinas lo que da como resultado una estructura compacta y rígida que no tiene una adecuada interacción con los puentes de hidrógeno al formarse los enlaces de hidrógeno intramoleculares, dando por tanto, una menor solubilidad.^{42,43}

Las principales propiedades físicas de las ciclodextrinas se encuentran resumidas en la (Tabla 3).

Tabla 3. Principales propiedades físicas de las CDs.³¹

Propiedades	Ciclodextrinas.		
	α	β	γ
Unidades de glucopiranososa.	6	7	8
Masa molar (g/mol).	973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å).	4.7 - 5.3	6.0 - 6.5	7.5 - 8.3
Temperatura de descomposición (°C).	250 - 260	255 - 265	240 - 245
Solubilidad en agua (g/100 mL H ₂ O a 25 °C)	14.50	1.85	23.20
Solubilidad en agua (mM).	149.02	16.30	178.87
Rotación de la luz polarizada.	150	162.5	177.4
Profundidad de la cavidad (Å).	7.9	7.9	7.9
Diámetro de la periferia (Å).	14.6	15.2	17.5
Volumen aproximado de la cavidad de la periferia por molécula (Å ³).	174	262	972
Volumen aproximado de la cavidad de la periferia por gramo (Å ³).	0.10	0.14	0.20
Moléculas de H ₂ O en la cavidad	8	11	17

1.10.2 Degradación y toxicidad de las ciclodextrinas.

En el tracto digestivo la degradación de las ciclodextrinas sigue la misma vía que la de los hidratos de carbono, las α - y β - ciclodextrinas son resistentes a la degradación por el ácido estomacal por lo que son hidrolizadas en el colon, mientras que la γ - ciclodextrina es digerida en la parte superior del tracto gastrointestinal por enzimas pancreáticas. Los metabolitos primarios de la digestión de las ciclodextrinas son glucosa y oligosacáridos de maltol que son metabolizados y absorbidos de la misma manera que el almidón. Se ha documentado que una mínima fracción de α - y β - ciclodextrinas puede ser absorbida intacta en la parte superior del intestino delgado por transporte pasivo, lo que puede

provocar la formación de complejos con sustancias de origen sintético o biológico, nutrimentos, esteroides o sales biliares produciendo descompensación de tales compuestos en el organismo. Sin embargo, esto sólo ocurre cuando se usan en dosis muy altas.⁴⁴ El DL_{50} en ratas vía oral es de 12.5, 18.8 y 8 g/kg para α -, β - y γ - ciclodextrinas respectivamente, lo que no origina una toxicidad aguda.

1.10.3 Principales usos de las ciclodextrinas

Una de las propiedades más significativas de las α -, β - y γ - ciclodextrinas es la posibilidad de formar complejos de inclusión con diversas moléculas orgánicas, lo que les ha dado una amplia gama de aplicaciones especialmente en la industria farmacéutica^{42,47} y de alimentos,⁴⁵ debido a su toxicidad prácticamente nula.

En la industria alimenticia se usan como conservadores de sabores y colores de origen vegetal y animal, evitan la degradación de sus componentes esenciales como vitaminas y algunos ácidos grasos.^{46,47,48}

Se usan en la industria cosmética para formular perfumes y desodorantes con el fin de que el olor perdure más⁴¹, ésta misma característica se usa para evitar olores desagradables en algunos pesticidas controlando al mismo tiempo su liberación^{11,12}. Actualmente el campo de aplicación más amplio de estos compuestos y algunos de sus derivados, principalmente de la β - ciclodextrina es la industria farmacéutica donde son usados principalmente para aumentar la solubilidad acuosa, estabilidad, absorción y biodisponibilidad y para prevenir la interacción fármaco-fármaco o fármaco-aditivo.⁴⁹

1.10.4 Formación de Complejos de Inclusión entre Ciclodextrinas y Moléculas Orgánicas

Un complejo de inclusión es la asociación entre una molécula huésped, que es susceptible de incluirse por su tamaño y polaridad, en una molécula anfitrión, se caracteriza por la ausencia de enlaces químicos covalentes. Particularmente, en el caso de las ciclodextrinas el fenómeno de inclusión consiste básicamente en la sustitución de las moléculas de H₂O que se encuentran dentro de su cavidad, por un huésped menos polar creándose de esta manera una interacción no covalente entre el huésped y la ciclodextrina.

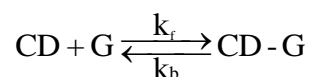
El fenómeno de complejación está basado en la relación estructura y selectividad de las moléculas involucradas, así como de los parámetros que influyen en la incorporación del huésped tales como:

- a) Sustitución de las interacciones apolares-polares de las moléculas de H₂O por las del sustrato con la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina y formación de las nuevas interacciones tipo Van der Waals
- b) Liberación de la tensión del anillo durante la complejación.
- c) Estabilización energética por solvatación ya que la hidratación del complejo es más favorable que la de los componentes individuales.
- d) Efectos estéricos ya que el volumen de alguna parte de la molécula o sus grupos funcionales pueden impedir la formación del complejo de inclusión
- e) Propiedades electrónicas ya que influyen directamente en la reactividad de las moléculas las cuales pueden reaccionar con mayor rapidez que la reacción de formación del complejo de inclusión.

Otros factores de importancia en la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas son la compatibilidad geométrica de la molécula huésped. Si el huésped no

tiene el tamaño adecuado no se ajustará dentro de la cavidad de la ciclodextrina. La estabilidad de los complejos de inclusión, está en función del carácter hidrófobo del sustrato, moléculas altamente hidrofílicas no formarían complejos de inclusión con ciclodextrinas y si los formaran la interacción sería muy débil. También la temperatura y el disolvente juegan un papel importante.^{39,40}

La formación de complejos en disolución es un proceso que se encuentra en un equilibrio dinámico, por lo tanto el huésped continuamente se asocia y disocia del anfitrión, en tanto que la velocidad de la reacción directa, se iguala a la velocidad de la reacción inversa.



Donde G es la molécula huésped y CD-G es el complejo de inclusión, la estabilidad de este complejo está descrita en términos de la constante de formación (K_f) o de su constante de disociación (K_d). Este proceso es energéticamente favorable debido a la formación de interacciones entre el huésped y la cavidad.

El proceso de inclusión de moléculas orgánicas con ciclodextrinas por lo general da lugar a una modulación de las propiedades físico-químicas de las moléculas involucradas, tales como aumento de la solubilidad, mejor estabilidad química, reducción de la toxicidad, etc.^{50,51}

2. HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

Hipótesis

Los compuestos o-difenólicos al incluirse en las ciclodextrinas experimentan modificaciones en sus propiedades físicas y químicas. Por lo tanto, se propone que su oxidación causada por la enzima polifenol oxidasa disminuya, haciendo que el oscurecimiento enzimático en frutas y verduras que los contienen, se demore.

Objetivo General

- Investigar por métodos electroquímicos y técnicas de simulación el mecanismo de interacción huésped-anfitrión en la inclusión en α - y β - ciclodextrinas de tres compuestos o-difenólicos naturales, los ácidos clorogénico, protocatecuico y cafeico, con el propósito de inhibir o retardar su oxidación enzimática.

Objetivos Particulares

- Determinar el comportamiento electroquímico en la oxidación de los tres compuestos o-difenólicos en medio de cloruro de potasio acuoso.
- Investigar por simulación digital los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica para dilucidar el mecanismo de oxidación de los compuestos o-difenólicos.
- Estudiar la variación de los parámetros electroquímicos de los compuestos o-difenólicos por la adición de las ciclodextrinas.
- Conocer la eficiencia del proceso de inclusión de los compuestos o-difenólicos en cada una de las ciclodextrinas y determinar las constantes de formación del complejo de inclusión ciclodextrina-compuestos o-difenólicos.

- Determinar a través de análisis estadístico si existe diferencia significativa en la determinación de las constantes de formación de los complejos de inclusión por las técnicas de voltamperometría cíclica y calorimetría y la preferencia de inclusión de los compuestos o-difenólicos en una u otra ciclodextrina.
- Observar el grado de oscurecimiento enzimático en matrices biológicas por adición de ciclodextrinas.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Equipo y material empleado

Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron en un potenciostato Autolab© modelo PGSTAT 100 acoplado a un ordenador que contiene el software GPES© con el que se logró almacenar, visualizar y analizar los datos obtenidos.

La simulación digital se llevó a cabo utilizando el software DigiElch 4.F

Para el pesado de los reactivos se utilizó una balanza marca Scaltec© modelo SBC 21 la cual permite pesar con precisión de décimas de miligramo.

Se utilizó un sonicador Cole Palmer© modelo 8891 para la solubilización de las muestras.

Para trabajar a temperatura constante, las muestras se colocaron en una celda enchaquetada de 15 mL la cual se unió a un recirculador de marca Thermo Scientific© modelo Nestlab RTE 7.

Se utilizaron electrodos de la marca BAS, el electrodo de trabajo utilizado fue de carbón vítreo, el de referencia fue de Ag/AgCl el cual se encontraba sumergido en una solución de KCl 3M, finalmente como contraelectrodo se utilizó un alambre de Pt el cual se encontraba enrollado con la finalidad de incrementar su superficie.

Para el pulido del electrodo de trabajo, se utilizó alúmina marca Leco© con tamaño de partícula de 0.05 μm , y suspensiones de alúmina marca Buöhler © de 5.0, 1.0 y 0.3 μm .

Para la adición de la disolución de α -ciclodextrina se utilizó una micro pipeta marca labopette© de capacidad 10-100 μL .

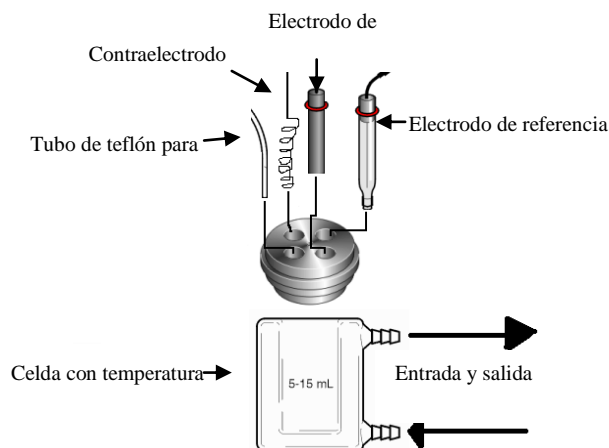


Figura 7. Celda electroquímica para los experimentos de voltamperometría cíclica.

3.2 Reactivos

Se utilizaron tres compuestos o-difenólicos.

- Ácido protocatecuico, PTC (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, No. CAS 99-50-3, 154.12 g/mol). (Sigma-Aldrich).
- Ácido cafeico, CAF (ácido 3,4-dihidroxicinámico, No. CAS 331-395, 180.16 g/mol). (Sigma-Aldrich).
- Ácido clorogénico, CGN (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexano 3-carboxílico (3,4-dihidroxicinamato, No. CAS 6001-76-9, 363.32 g/mol). (Fluka).

Se emplearon α - y β -ciclodextrinas de Sigma-Aldrich y sus especificaciones son las siguientes:

- α -ciclodextrina No.CAS 10016-20-3, 972.84 g/mol.
- β -ciclodextrina No CAS 7585-39-3, 1134.98 g/mol

Se utilizó KCl. CAS 7447-40-7, 74.55 g/mol.

Para el burbujeo de las soluciones se usó nitrógeno de alta pureza (99.999 %) de Infra.

3.3 Metodología:

La preparación de las muestras para voltamperometría cíclica se realizó de la siguiente manera.

Inicialmente se pesó la cantidad adecuada del compuesto *o*-difenólico para obtener 10 mL de disolución cuya concentración final aproximada, en el caso de ácido clorogénico y del ácido protocatecuico, fuera 1 mM y de 0.7 mM para el ácido cafeico; este sólido se colocaba en un matraz aforado de 10 mL de capacidad, aforándose con la solución de KCl 1M. Posteriormente, se sometía a sonicación para obtener una disolución homogénea. En el caso de los ácidos clorogénico y protocatecuico el tiempo de sonicación fue de 90 segundos, mientras que para el ácido cafeico eran necesarios 10 minutos. Una vez lista la disolución a estudiar ésta se burbujeaba por un periodo de 30 minutos con nitrógeno de alta pureza.

3.3.1 Preparación de las ciclodextrinas

La α -ciclodextrina presenta una alta solubilidad por lo que cada vez que se utilizó fue posible realizar una dilución de concentración 0.1M, la cual se preparó pesando la cantidad adecuada de ella, posteriormente se colocaba en un matraz aforado de 2 mL y se aforaba con la misma solución del compuesto *o*-difenólico a estudiar, finalmente se sometía a sonicación por un periodo de 90 segundos.

La β -ciclodextrina presenta menor solubilidad que la α -ciclodextrina por lo que no fue posible realizar una disolución previa, debido a esto se pesaban 0.0113 g +/- 0.0005 g justo antes de cada adición.

Sistema de electrodos

- Electrodo de trabajo:

Antes de comenzar cualquier determinación el electrodo de carbón vítreo se pulía con alúmina de tamaño de partícula de 0.05 μm , el exceso de ésta se eliminaba con agua destilada y sonicación por 30 segundos. Además, entre cada analito estudiado, el electrodo de trabajo se pulía con suspensiones de alúmina de distintos tamaños de partícula (5.0, 1.0, 0.3 y 0.05 μm), el pulido se llevaba a cabo utilizando las alúminas en orden descendente, es decir, se utilizaba primero la de mayor tamaño y se terminaba de pulir con la que presentaba el menor tamaño de partícula, entre cada pulido se retiraba el exceso de alúmina con agua destilada.

- Acomodo de electrodos:

Los tres electrodos se colocaron en una celda encaquetada no dividida (figura 7).

3.3.2 Determinaciones voltamperométricas

Previo a la determinación voltamperométrica, la disolución del compuesto o-difenólico contenida dentro de la celda se sometía durante 30 minutos a burbujeo con nitrógeno de alta pureza. Pasado dicho periodo se colocaba el sistema de tres electrodos y se suspendía el burbujeo.

Para cada disolución del compuesto estudiado se obtuvieron voltamperogramas por duplicado a las siguientes velocidades de barrido, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 10 V/s. Entre cada determinación, mientras se pulía el electrodo de trabajo, se continuaba burbujeando la disolución por 30 segundos para mantener una atmósfera de nitrógeno y de ésta manera mantenerla libre de oxígeno.

Una vez obtenida la serie de experimentos a todas las velocidades de barrido de las soluciones de compuestos o-difenólicos, se comenzaba a agregar gradualmente la ciclodextrina. La disolución 0.1M de α -ciclodextrina se añadía de 50 en 50 μL con ayuda de una micropipeta, hasta dejar de observar cambios en las corrientes de los picos. Para el caso de la β -ciclodextrina ésta se pesaba (0.012g \pm 0.002g) y agregaba en el momento de llevar a cabo la voltamperometría, se realizaron un total de 10 adiciones hasta llegar a 10 mM. Los voltamperogramas se obtenían por duplicado, y se realizaban las determinaciones desde la velocidad de barrido más baja (0.1 V/s) hasta la mas alta (10 V/s).

4. RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

4.1 Mecanismo de la oxidación electroquímica de los ácidos o-difenólicos protocatecuico, cafeico y clorogénico por voltamperometría cíclica.

Los potenciales de oxidación o de reducción de los compuestos protocatecuico, cafeico y clorogénico determinados en este trabajo se midieron por voltamperometría cíclica a 25°C usando un electrodo de carbón vítreo en agua como disolvente y KCl 0.1M como electrolito soporte.

Los voltamperogramas de los tres ácidos o-difenólicos se muestran en la figura 8.

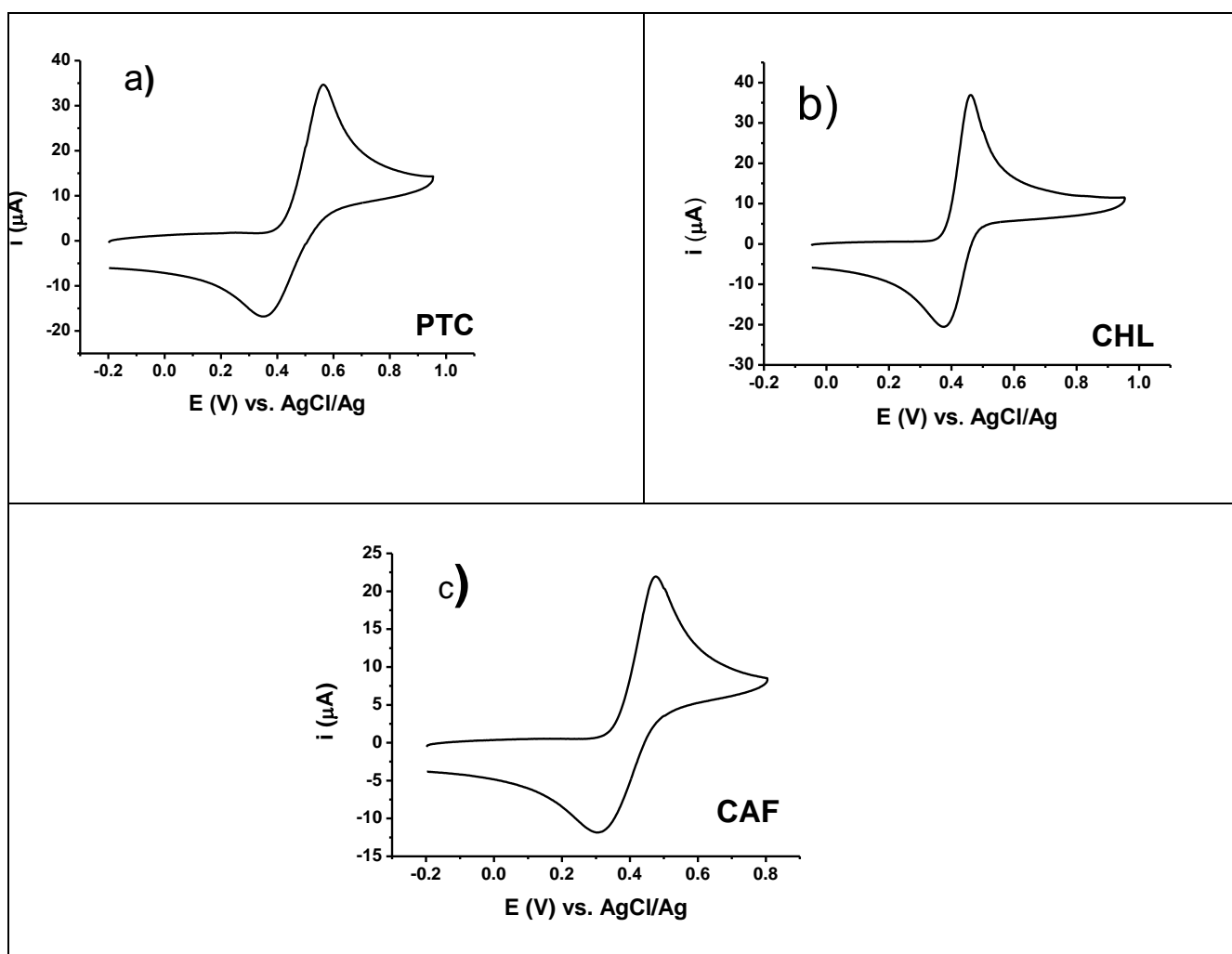


Figura 8. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico de los ácidos a) protocatecuico, b) clorogénico y c) cafeico, en medio de KCl 0.1 M a 0.1V/s y 25°C.

Para investigar el posible mecanismo de reacción, se determinaron los voltamperogramas de los ácidos *o*-difenólicos. Se encontró que se oxidan en un proceso irreversible a sus correspondientes quinonas por la transferencia de dos electrones y la pérdida de dos protones. En este medio electrolítico su potencial de oxidación estuvo comprendido entre 0.486 y 0.561 V, en tanto que la reducción se encontró entre los potenciales 0.295 y 0.352 V, las corrientes de pico y el ΔE_p confirman la irreversibilidad del proceso Tabla(4).

Tabla 4. Potenciales de oxidación y de reducción de los compuestos *o*-difenólicos en medio acuoso de KCl 1.0 M obtenidos a 0.1 V/s.

Compuesto	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)
Ácido protocatecuico	0.561	0.352	0.209
Ácido cafeico	0.486	0.295	0.191
Ácido clorogenico	0.529	0.334	0.195

Teniendo en mente los valores de pKa de los ácidos fenólicos, que son 4.35, 4.43 y 3.34 para PTC, 8.79, 8.69 para CAF y 8.6, 5.5 para CHL en medio de KCl 1.0 M, se hace evidente que los grupos carboxílicos, -COOH se encuentran en su forma disociada, en tanto que los grupos hidroxilo -OH de los fenoles están en su forma no disociada. Por lo tanto, se descartó cualquier trayectoria de oxidación involucrando la disociación previa de los -OH fenólicos, lo que condujo a la exclusión de varios posibles mecanismos de reacción. A partir de los razonamientos anteriores, únicamente se consideraron los mecanismos que se presentan en la tabla 5, los cuales podrían utilizarse para explicar la oxidación de los compuestos *o*-difenólicos a sus quinonas bajo las condiciones experimentales empleadas.

Tabla 5. Posibles mecanismos^a, propuestos para la oxidación de los ácidos o-difenólicos (PTC, CAF y CHL, representados de manera general como H₂Q^b).

Mecanismo EECC	^c	Mecanismo ECCE	^c	Mecanismo ECEC	^c
$H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{++} + e^-$	(2)	$H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{++} + e^-$	(2)	$H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{++} + e^-$	(2)
$H_2Q^+ \rightleftharpoons H_2Q^{2+} + e^-$	(3)	$H_2Q^+ \rightleftharpoons HQ^\bullet + H^+$	(6)	$H_2Q^+ \rightleftharpoons HQ^\bullet + H^+$	(6)
$H_2Q^{2+} \rightleftharpoons HQ^+ + H^+$	(4)	$HQ^\bullet \rightleftharpoons Q^{\bullet-} + H^+$	(7)	$HQ^\bullet \rightleftharpoons HQ^+ + e^-$	(9)
$HQ^+ \rightleftharpoons Q + H^+$	(5)	$Q^{\bullet-} \rightleftharpoons Q + e^-$	(8)	$HQ^+ \rightleftharpoons Q + H^+$	(5)

^a“E” ejemplifica un paso electroquímico y “C” un paso químico. ^bMedio KCl 1M. ^cNúmero de reacción.

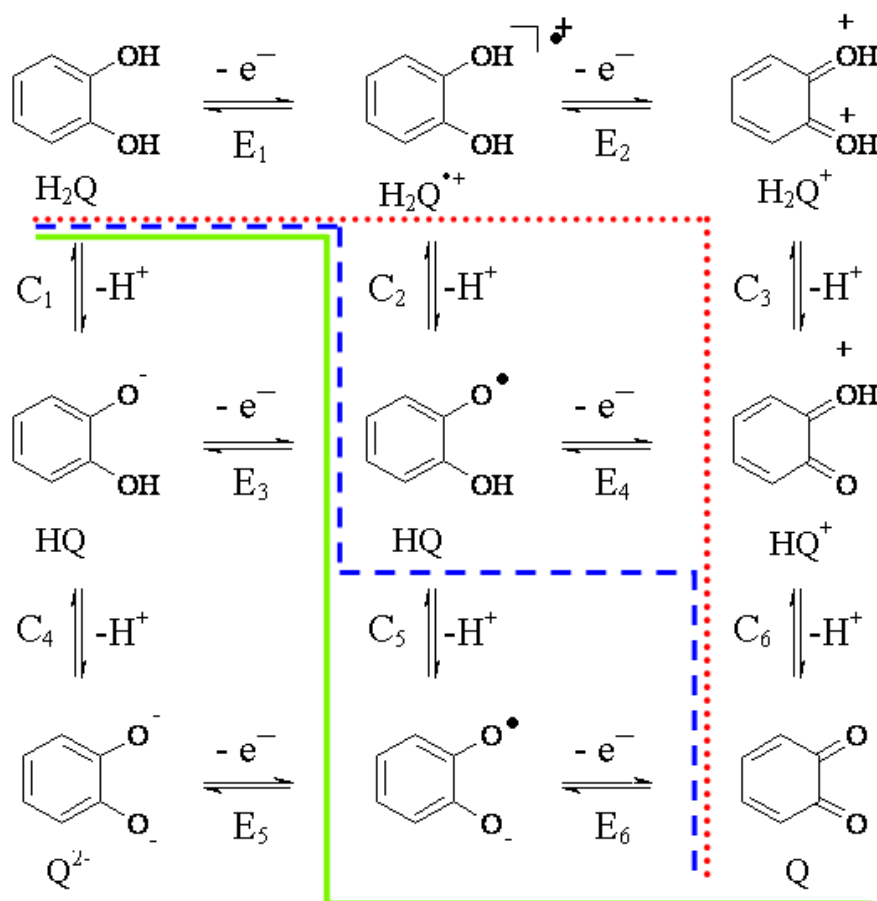


Figura 9. Posibles rutas de oxidación de compuestos fenólicos. H₂Q representa a los ácidos protocatecuico, cafeico y clorogenico, Q a sus respectivas quinonas.

4.2 Simulación digital

Para determinar por cuál de estos tres posibles mecanismos de reacción se lleva a cabo la oxidación de los compuestos o-defenólicos en presencia de las ciclodextrinas, se utilizó la técnica de simulación a partir del modelo cinético de Butler-Volmer, teniendo como parámetros ajustables para las reacciones electroquímicas el potencial de oxidación o de reducción ($E^{\circ}_{1/2}$), la constante heterogénea de transferencia de electrones (k_s) y el coeficiente de transferencia (α). Para las reacciones químicas los parámetros ajustables fueron las constantes de equilibrio (K) y las constantes de velocidad para la reacción directa e inversa (k_d y k_f , respectivamente).

La concentración de H^+ que se introdujo en el programa de simulación se determinó experimentalmente a partir del pH de las soluciones del ácido o-difenólico correspondiente, en el medio de KCl 1 M. El coeficiente de difusión (D) se dejó también como un parámetro ajustable, con el mismo valor para las diferentes especies, excepto para el H^+ , para el cual se utilizó un valor de $9.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Se estudió cada uno de los mecanismos descritos en la tabla 5 comparando los voltamperogramas experimentales de los diferentes ácidos o-difenólicos en su forma libre con los voltamperogramas obtenidos por medio de simulación digital. Después del análisis de los tres compuestos o-difenólicos y probando una serie de combinaciones de parámetros (con la ayuda de la herramienta “fitting routine” del programa DigiElch), se llegó a la conclusión de que tanto el mecanismo ECCE, representado por las reacciones (2), (6)-(8) (línea verde), como el mecanismo ECEC, representado por las reacciones (2), (6), (9) y (5) (línea azul), producen muy buena concordancia con los voltamperogramas experimentales.

La Figura 10 muestra ejemplos de los voltamperogramas cíclicos obtenidos por simulación y los obtenidos experimentalmente de los tres ácidos o-difenólicos en estudio.

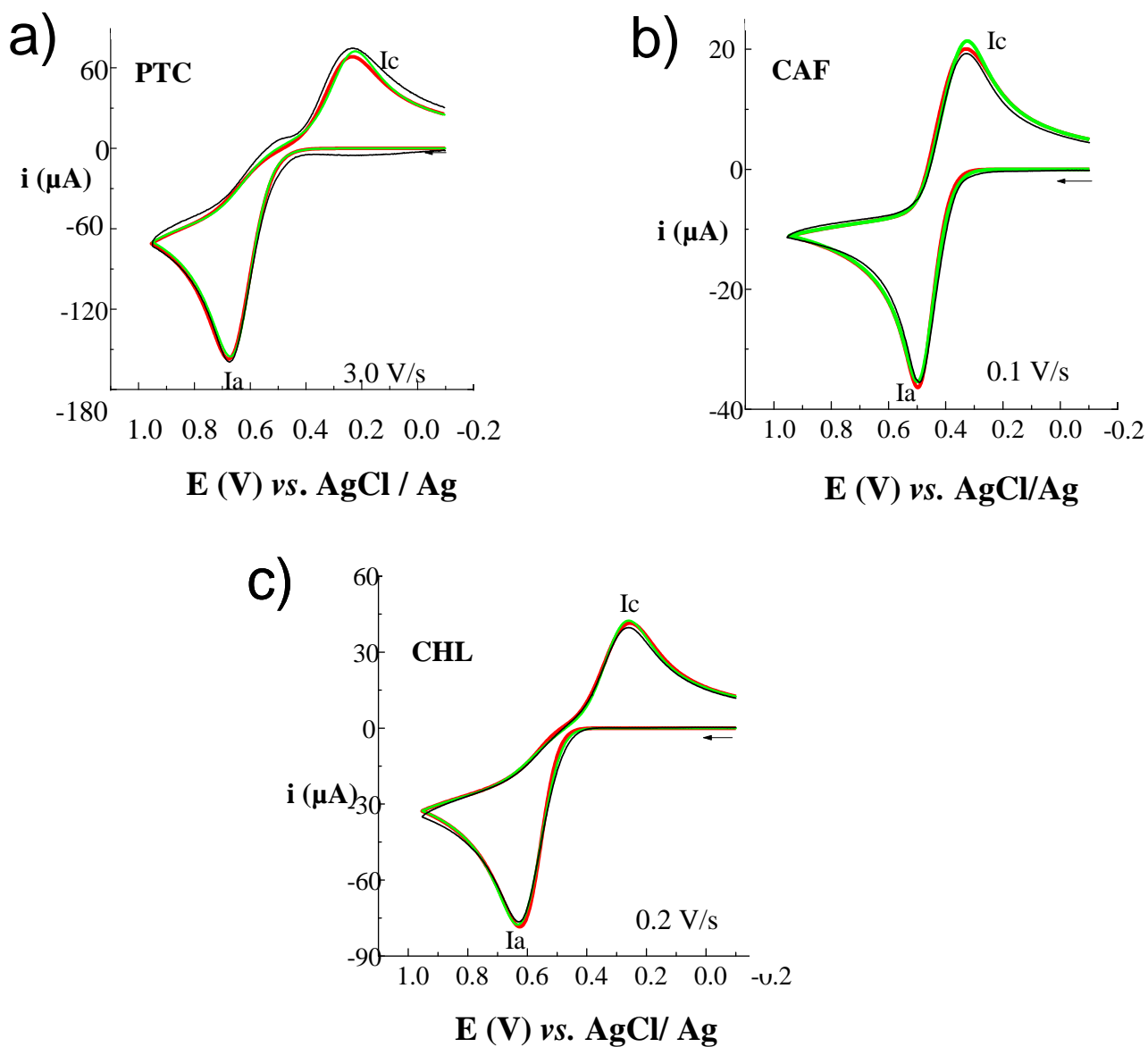


Figura 10. Voltamperogramas cíclicos representativos (corridos a diferentes velocidades de barrido a 25°C, en medio de KCl 0.1 M) del comportamiento electroquímico de los ácidos: a)protocatecuico; b) cafeico y c) clorogénico, representados por línea negra. Simulaciones de acuerdo a los mecanismos ECCE (línea verde) y ECEC (línea azul) descritos en la Tabla 5.

El perfecto ajuste entre los voltamperogramas experimentales y los obtenidos por simulación indican que para los tres ácidos o-difenólicos, tanto el mecanismo ECCE como el ECEC, explican adecuadamente el paso de H_2Q a Q , por lo que se puede trabajar con cualquiera de estos mecanismos para determinar las constantes de formación de los compuestos de inclusión de los ácidos o-difenólicos con las ciclodextrinas (*vide infra*).

4.3 Oxidación de los ácidos o-difenólicos, protocateuico, cafeico y clorogénico en presencia de α - y β -ciclodextrinas.

Se determinó el comportamiento voltamperométrico de soluciones acuosas de los ácidos protocateuico, cafeico y clorogénico en presencia de concentraciones crecientes de α - y β -ciclodextrinas en concentraciones comprendidas entre 0.05 y 10.0 mM. En las figuras (10-15) se muestran los voltamperogramas experimentales obtenidos.

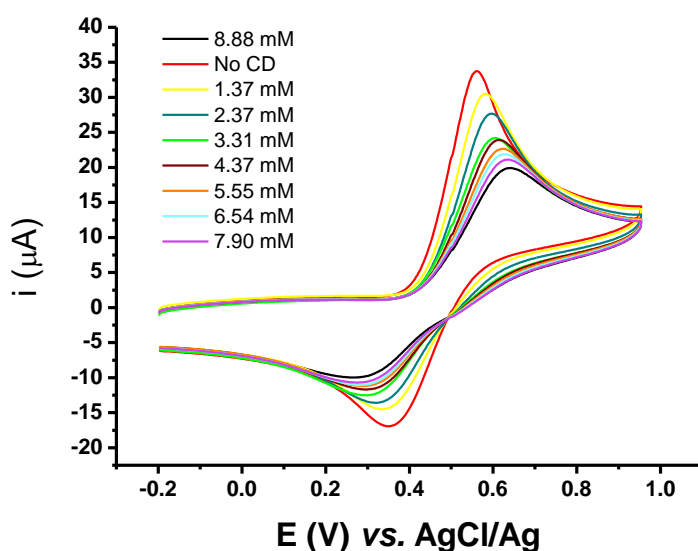


Figura 10. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico del ácido protocateuico en concentración de 0.98 mM, la línea roja pertenece al compuesto libre (sin adición de ciclodextrina). Todos los demás voltamperogramas cíclicos pertenecen al aumento progresivo de β -ciclodextrina en la solución del ácido protocateuico.

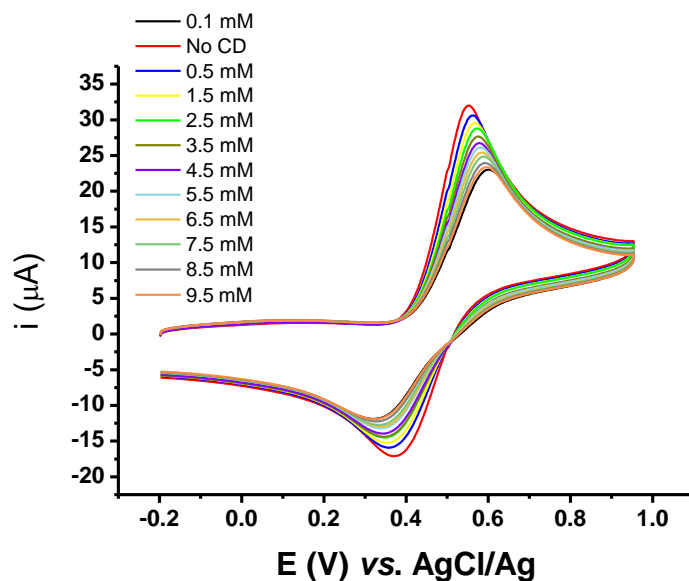


Figura 11. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico del ácido protocatecuico en concentración 1.04 mM, la línea roja pertenece al compuesto libre (sin adición de α -ciclodextrina). Todos los demás voltamperogramas cíclicos pertenecen al aumento sucesivo de α -ciclodextrina en la solución de ácido protocatecuico.

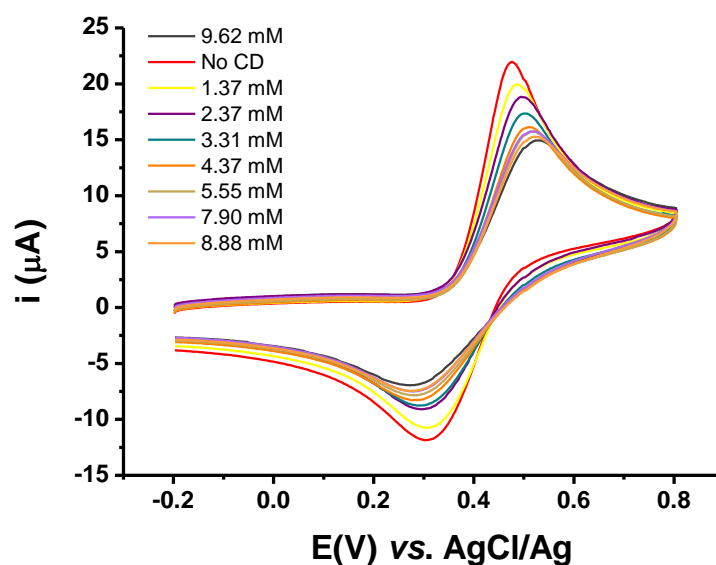


Figura 12. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico del ácido cafeico en concentración 0.72 mM, la línea roja pertenece al compuesto libre (sin adición de β -ciclodextrina). Todos los demás voltamperogramas cíclicos pertenecen al aumento progresivo de β -ciclodextrina en la solución de ácido cafeico.

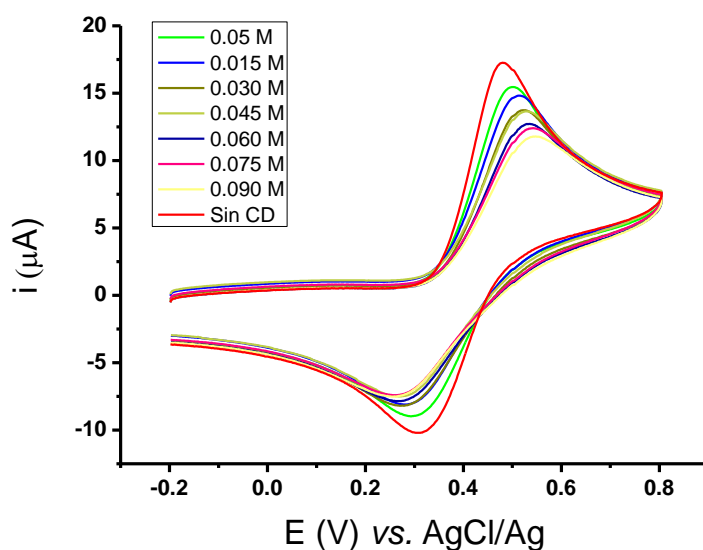


Figura 13. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico del ácido cafeico en concentración 0.73 mM, la línea roja pertenece al compuesto libre (sin adición deciclodextrina). Todos los demás voltamperogramas cíclicos pertenecen al aumento gradual de α -ciclodextrina en la solución de ácido cafeico.

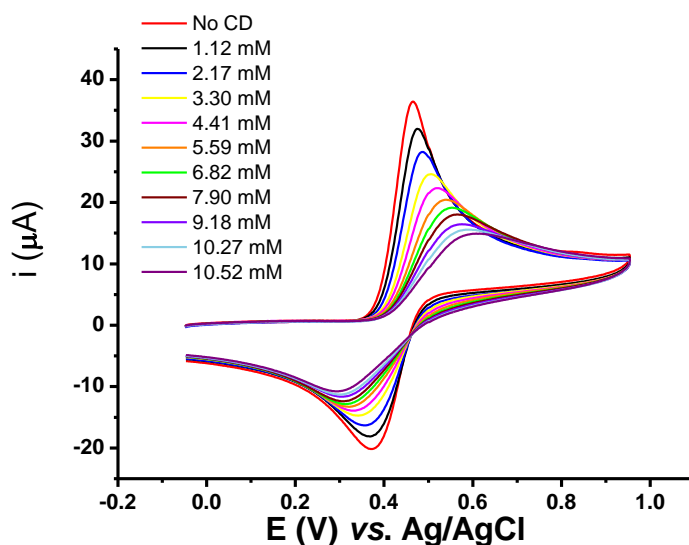


Figura 14. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico del ácido clorogénico en concentración de 0.98 mM, la línea roja pertenece al compuesto libre (sin adición de β -ciclodextrina). Todos los demás voltamperogramas cíclicos pertenecen al aumento progresivo de β -ciclodextrina en la solución de ácido clorogénico.

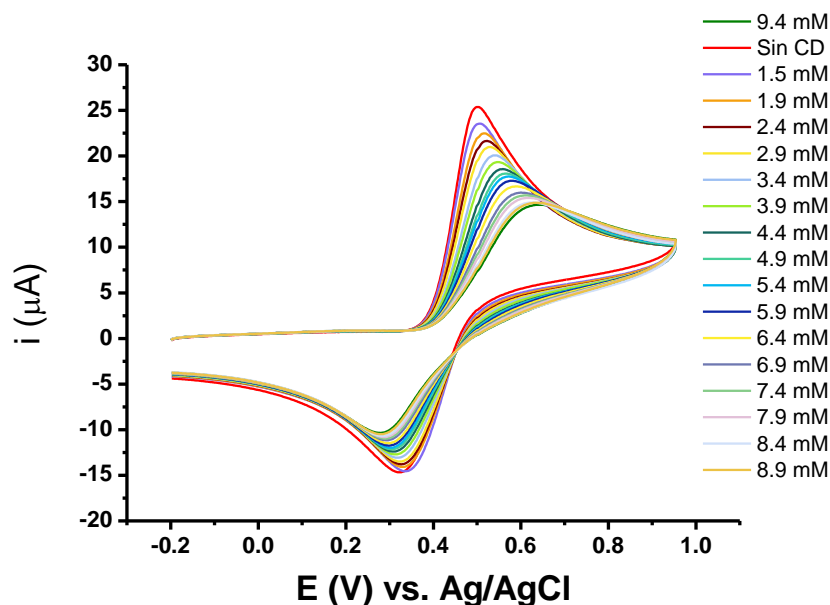


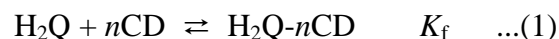
Figura 15. Voltamperogramas cíclicos representativos del comportamiento electroquímico del ácido clorogénico en concentración 1.04 mM, la línea roja pertenece al compuesto libre (sin adición de α -ciclodextrina) Todos los demás voltamperogramas cíclicos pertenecen al aumento sucesivo en moles de α -ciclodextrina en la solución de ácido clorogénico.

En todos los casos se encontró que la adición de α - o β -ciclodextrina, provoca una disminución sustancial en la corriente de los picos, así como un incremento en el ΔE_p ($E_{p_{Ia}} - E_{p_{Ic}}$). Además se observó que el pico de oxidación **Ia**, se desplazó a valores más positivos y el pico de reducción **Ic** a valores más negativos.

En las figuras 10-15 se observa la disminución en las corrientes de pico I_{pa} e I_{pc} , la cual es característica de la formación de complejos de inclusión y se debe a que la inclusión del huésped (ácido o-difenólico) en la cavidad de la ciclodextrina disminuye su coeficiente de difusión (D) con respecto a la forma libre y debido a que la corriente y el coeficiente de difusión son inversamente proporcionales, el resultado es una disminución en la corriente.¹ Así mismo, esta disminución en la corriente se debe a que hay una menor concentración del analito libre en la disolución.

4.4 Caracterización voltamperométrica de los complejos de inclusión entre los ácidos fenólicos y las ciclodextrinas. Constantes de formación.

Los experimentos voltamperométricos ponen de manifiesto la formación de complejos de inclusión entre los ácidos o-difenólicos (H_2Q) y las ciclodextrinas, la reacción de formación de los complejos se presenta a continuación.



En donde K_f corresponde a la constante de equilibrio para la formación del complejo y n es el número de moléculas deciclodextrina.

Para determinar las constantes de formación (K_f) de los complejos de inclusión, los voltamperogramas experimentales obtenidos de las soluciones acuosas de los ácidos protocatecuico, cafeico y clorogenico en presencia de concentraciones crecientes de α - y β -ciclodextrinas (figuras 10-15) se compararon con los voltamperogramas obtenidos por simulación digital. El mecanismo de reacción que se decidió utilizar a partir de los resultados anteriores fue el mecanismo ECEC, haciendo las siguientes consideraciones:

- Únicamente el compuesto o-difenólico libre (H_2Q) es electroactivo por lo que puede reaccionar con el electrodo.
- El compuesto o-difenólico libre se oxida por el mecanismo ECEC, como se ha encontrado en estudios de estos compuestos en ausencia de ciclodextrinas.
- Se asumió que los valores de los parámetros de simulación obtenidos en ausencia de ciclodextrina no cambian en presencia de ésta.
- La velocidad de las reacciones de asociación y disociación de los ácidos o-difenólicos con la ciclodextrina son rápidas.

- La constante de formación usada en la simulación es sólo para una especie del ácido o-difenólico. Es decir, las especies ácido carboxílico y carboxilato se asume que se comportan igual.
- El producto de la oxidación, el derivado o-benzoquinona libre, puede también estar unido a la ciclodextrina.

Por lo tanto, la reacción (1), con $n = 1$, se introdujo en el programa DigiElch, junto con la secuencia de reacciones (2)-(6)-(9)-(5), correspondientes al mecanismo ECEC. Se consideró también, que en la escala de tiempo del experimento, las constantes de rapidez para la formación del complejo son lo suficientemente rápidas como para mantener el equilibrio, de tal forma que los valores de estas constantes se fijaron en el límite de la difusión ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), dejando la K_f como el único parámetro ajustable de la reacción (1). Así, el valor de K_f se fue modificando sistemáticamente en el programa de simulación, hasta encontrar la serie de parámetros que proporcionó la mejor concordancia a lo largo de todos los voltamperogramas cíclicos experimentales obtenidos en el intervalo de concentraciones estudiado. Los resultados se muestran en las figuras 16 y 17.

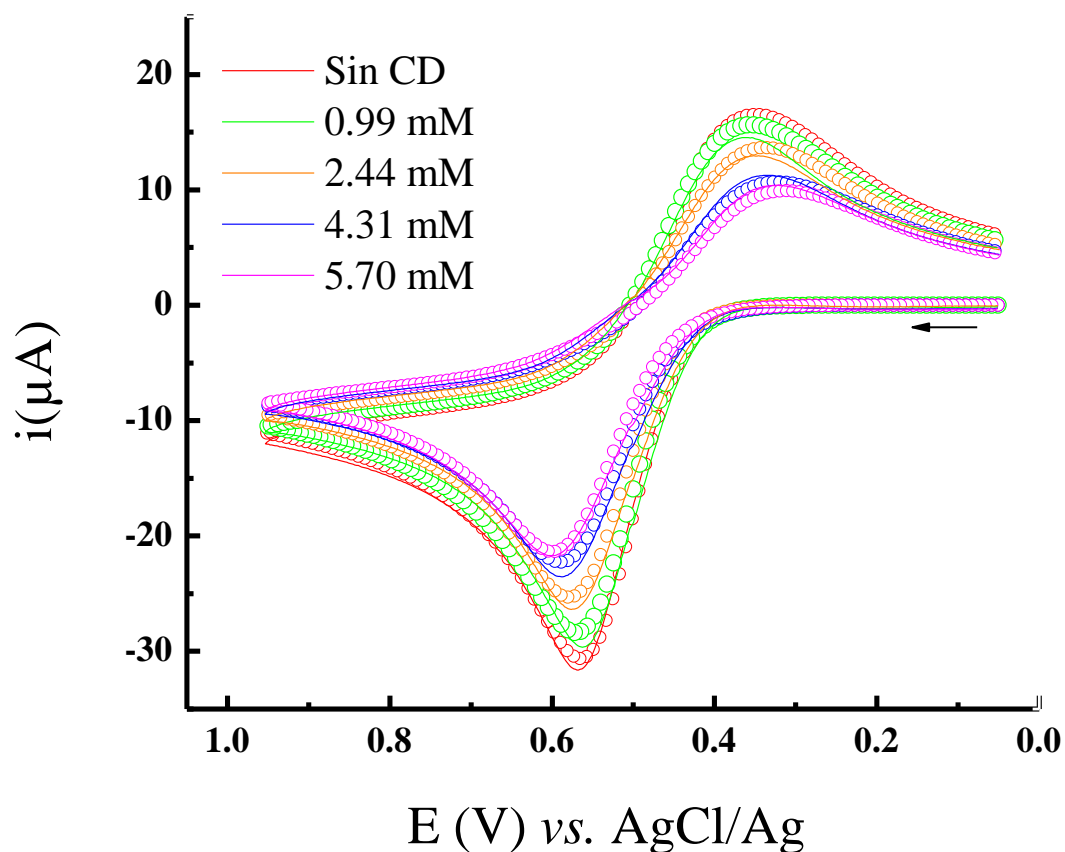


Figura 16. Voltamperogramas cíclicos experimentales (línea continua) del ácido protocatecuico 1.05 mM en 1.0 M de KCl en presencia de diferentes concentraciones de α -ciclodextrina. Simulación digital (línea con círculos) considerando el mecanismo ECEC y la reacción de complejación (1), con los valores de K_f y la relación D_c/D_f descritos en la Tabla 6.

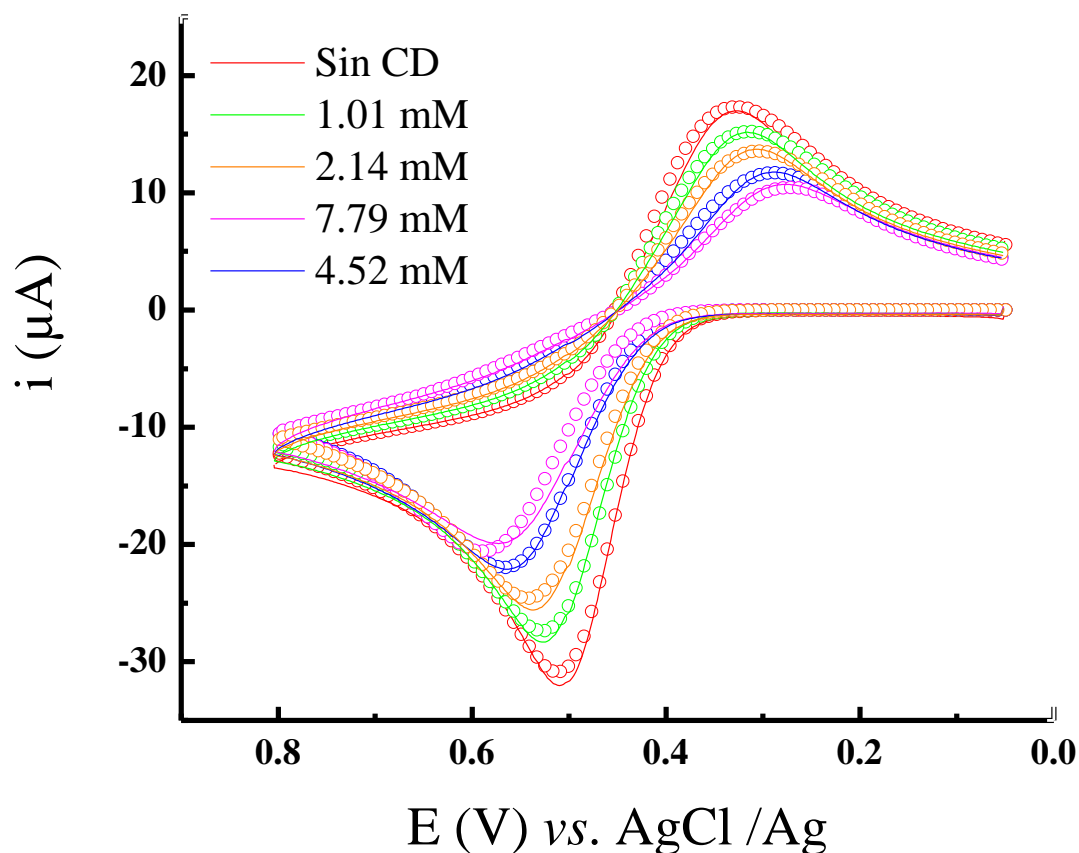


Figura 17. Voltamperogramas cíclicos experimentales (línea continua) del ácido clorogénico 1.17 mM en 1.0 M de KCl en presencia de diferentes concentraciones de β -ciclodextrina. Simulación digital considerando el mecanismo ECEC y la reacción de complejación (10), con los valores de K_f y la relación D_c/D_f descritos en la Tabla 6.

A partir de la simulación se lograron obtener los valores de las constantes de formación (K_f) determinadas para cada uno de los ácidos fenólicos los cuales se presentan en la Tabla 6. Cabe mencionar que durante la simulación de los voltamperogramas cíclicos en presencia de ciclodextrina, se determinó también el coeficiente de difusión del complejo de inclusión, D_c , para lo cual se varió su valor sistemáticamente hasta lograr un buen ajuste

de la corriente de los picos. En tanto el coeficiente de difusión del compuesto libre, D_f , se mantuvo en el valor determinado a partir de los voltamperogramas cíclicos en ausencia de ciclodextrina. Se observó que para todos los sistemas estudiados, el coeficiente de difusión del complejo es aproximadamente 35-50% menor que el coeficiente de difusión del huésped libre (H_2Q) (Tabla 6).

Utilizando la técnica de titulación calorimétrica también se determinaron las constantes de equilibrio (K_f) para la formación de los complejos de inclusión (tabla6).

Tabla 6. Constantes de formación para los complejos de inclusión de los compuestos *o*-difenólicos con α - y β - ciclodextrinas por voltamperometría cíclica y calorimetría.

Complejo	K_f^a (M^{-1})	K_f^b (M^{-1})	D_c/D_f^a
PTC: α CD	5.0×10^2	6.4×10^2	0.35
PTC: β CD	7.5×10^2	3.6×10^2	0.36
CAF: α CD	3.5×10^3	1.3×10^3	0.35
CAF: β CD	1.0×10^3	4.8×10^2	0.30
CHL: α CD	1.5×10^3	7.9×10^2	0.44
CHL: β CD	9.0×10^2	1.2×10^3	0.50

Determinados en medio acuoso de KCl 1.0 M a 25°C. Obtenidos por: ^a simulación digital de los voltamperogramas cíclicos y ^b por titulación calorimétrica.

4.5 Análisis estadístico

Comparando los valores de las constantes de formación obtenidos por voltamperometría cíclica con los obtenidos por calorimetría se observa que prácticamente se encuentran en el mismo orden de magnitud y lo mismo pasa al comparar los valores de las constantes obtenidas al aplicar α - o β -ciclodextrinas con el mismo ácido *o*-difenólico. Sin embargo, para verificar que no existe diferencia significativa entre los valores de las K_f determinadas por cualquiera de los dos métodos utilizados y para conocer si existe preferencia de inclusión entre una u otra ciclodextrina se realizaron los análisis de varianza pertinentes.

En primer lugar se determinó si existía alguna propensión de los compuestos *o*-difenólicos a estar incluidos en la α o en la β -ciclodextrina, para lo cual se consideraron los valores de las constantes de formación determinadas por medio de voltamperometría cíclica. Así, estos valores se agruparon entre los que se obtuvieron por adición de α -ciclodextrina y los que se obtuvieron por adición de β -ciclodextrina (tabla 7).

Tabla 7. Constantes de formación^a para los complejos de inclusión de los compuestos *o*-difenólicos con las α - y β - ciclodextrinas.

Ácido <i>o</i> -difenólico	K_f obtenida agregando	
	α -CD	β -CD.
Protocatecuico	5×10^2	7.5×10^2
Cafeico	3.5×10^3	1×10^3
Clorogénico	1.5×10^3	9×10^2

^aDeterminadas a partir de VC.

A partir de estos valores se realizó el análisis estadístico que se presenta a continuación, marcando como hipótesis nula (H_0) que la inclusión de compuestos o-difenólicos en α -ciclodextrina es igual a la inclusión de compuestos o-difenólicos en β -ciclodextrina y como hipótesis alterna (H_1) se propone que la inclusión de compuestos o-difenólicos en α -ciclodextrina es diferente a la inclusión de compuestos o-difenólicos en β -ciclodextrina.

La suma de cuadrados (SC) del total se calculó con la ecuación 1:

$$SC_{TOTAL} = \Sigma X^2 - [(\Sigma X)^2/n] \quad (1)$$

ΣX^2 es la suma de los valores X elevados al cuadrado.

$(\Sigma X)^2$ es el cuadrado de la suma de los valores X.

n es el número total de observaciones.

La suma de cuadrados del método empleado (tratamiento) se calculó con la ecuación 2:

$$SC_{método} = [(T_c^2)/n_c] - [(\Sigma X)^2/n] \quad (2)$$

T_c es el total de la columna de cada método

n_c es el número de observaciones (tamaño de la muestra) de cada método.

La suma de cuadrados del error se obtiene por substracción del $SC_{método}$ al SC_{TOTAL} (ecuación 3).

$$SC_{\text{error}} = SC_{\text{TOTAL}} - SC_{\text{método}} \quad (3)$$

La media de cuadrados (MC) del método se calculó dividiendo la suma de cuadrados del método sobre el número de métodos analizados menos uno (ecuación 4).

$$MC_{\text{método}} = [SC_{\text{TOTAL}} / (k-1)] \dots\dots(4)$$

K es el número de métodos (tratamientos) analizados.

El cuadrado medio del error se calculó dividiendo la suma de cuadrados del error entre el número total de observaciones menos el número de métodos (ecuación 5).

$$MC_{\text{error}} = [SC_{\text{error}} / (n-k)] \dots\dots(5)$$

n es el número total de observaciones.

El valor F calculado se obtuvo al dividir el cuadrado medio del método entre el cuadrado medio del error (ecuación 6).

$$F_c = SC_{\text{TOTAL}} / SC_{\text{error}} \dots\dots(6)$$

Tabla 8. ANOVA para determinar si existe diferencia significativa entre la inclusión de los compuestos en α y β -ciclodextrina.

Fuente de variación	SC	^a g.l	MC	Fc	^b α	^c Ft	Criterio
Método	9.52×10^5	2-1=1	9.52×10^5	0.140	0.05	4.96	Si $F_c < F_t$
Error	6.78×10^5	12-2=10	6.78×10^6				H ₀ se
Total	7.74×10^6	12-1=11					acepta

^a grados de libertad, ^b nivel de confianza y ^c valor de Fisher obtenido de tablas.

Utilizando un 95% de confianza se llegó a la conclusión de que no existe diferencia significativa entre la inclusión de los compuestos o-difenólicos con α o β -ciclodextrina, es decir, con una posibilidad de equivocación de 5 entre cien se puede decir que los compuestos o-difenólicos se incluyen por igual en α -ciclodextrina que en β -ciclodextrina.

De la misma manera se realizó el análisis estadístico pertinente para determinar una posible diferencia significativa entre las constantes de formación obtenidas por voltamperometría cíclica y las obtenidas por calorimetría (Tabla 6). Los cálculos se realizaron utilizando las ecuaciones, la única diferencia fue que en este caso el tratamiento en lugar de ser el método empleado es la ciclodextrina utilizada.

La hipótesis nula (H₀) planteada indica que las constantes de formación determinadas por voltamperometría cíclica son iguales a las determinadas por calorimetría, mientras que la hipótesis alterna (H₁) expresa que las constantes de formación determinadas por voltamperometría cíclica son diferentes a las constantes de formación determinadas por calorimetría.

Tabla 9. ANOVA para determinar si hay diferencias entre las técnicas de voltamperometría cíclica y calorimetría.

Fuente de variación	SC	g.l	MC	Fc	α	Ft	Criterio
Método	1.35×10^6	2-1=1	1.35×10^6	0.29	0.05	7.7	Si $F_c < F_t$ H_0 se acepta
Error	4.70×10^6	6-2=4	4.70×10^6				
Total	6.05×10^6	6-1=5					

^a grados de libertad, ^b nivel de confianza y ^c valor de Fisher obtenido de tablas.

Con una confianza del 95% se puede decir que no existe diferencia significativa entre las K_f obtenidas por las técnicas de voltamperometría cíclica y calorimetría, es decir, con una posibilidad de equivocación de 5 entre cien se puede decir que es igual determinar las constantes de formación por medio de voltamperometría cíclica que por calorimetría.

4.6 Pruebas de aplicación de β -ciclodextrina en matrices biológicas

Una vez que se determinaron las constantes de equilibrio y se encontró que la formación de complejos de inclusión entre los compuestos o-difenólicos y las ciclodextrinas es un proceso favorable, se decidió probar en muestras de fruta fresca (pera y aguacate) la aplicación de una solución de β -ciclodextrina para observar los cambios físicos a lo largo del tiempo.

Se preparó una disolución de β -ciclodextrina cuya concentración fue 9 mM, la cual se vertió en una caja petri de vidrio y en un vaso de precipitado de 100 mL. Con ayuda de una navaja se dividieron las frutas por la mitad e inmediatamente después del corte se retiraron las semillas.

La aplicación de la solución de β -ciclodextrina en el aguacate se realizó sumergiendo la muestra en el vaso de precipitado por dos minutos, pasado este tiempo se retiró de la disolución y se colocó junto a la muestra control.

La pera se puso con el corte transversal dentro de la caja petri por un periodo de dos minutos, después de este tiempo se retiró la muestra y se situó a un lado de la muestra control donde se inició el registro. En ambas frutas se prestó especial cuidado en impregnar en su totalidad la superficie que se obtuvo al realizar los cortes con la solución de β -ciclodextrina.

En las figuras 18 -20 se muestran las imágenes de los resultados obtenidos.

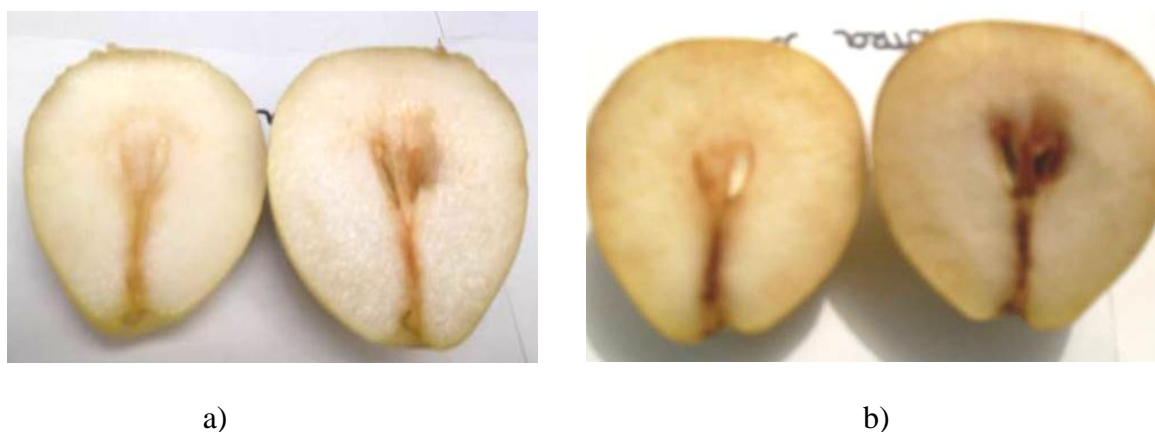


Figura 18. A la izquierda de cada imagen se encuentra la pera con ciclodextrina y a la derecha la pera control. Imágenes captadas después de haber realizado los cortes en la fruta: a) a los 5 minutos y b) a las 7 horas.

La muestra control presentó colores pardos principalmente en la línea central, su superficie permaneció con un tono mas oscuro que el que presentó la muestra a la que se le aplicó β -ciclodextrina. La muestra a la que se le aplicó ciclodextrina presentó un menor

pardeamiento enzimático, lográndose observar una diferencia substancial entre ambas muestras.

Así mismo, en el caso del aguacate los resultados obtenidos muestran una diferencia entre la muestra control y aquella que estuvo sometida a la disolución de β -ciclodextrina (figura 19).

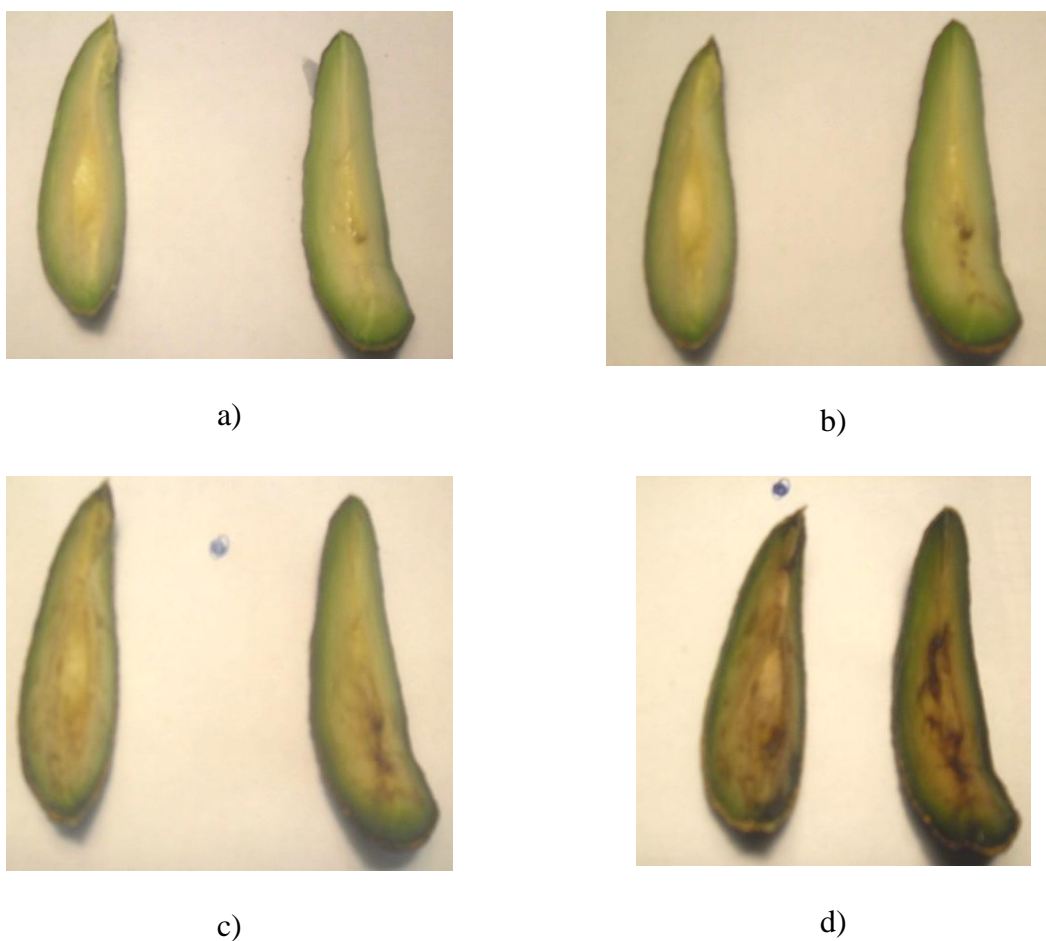


Figura 19. A la izquierda de cada imagen se encuentra la muestra de aguacate con ciclodextrina y a la derecha la muestra control. Imágenes captadas después de: a) 2 minutos.

b) 1.40 horas. c) 3.72 horas. d) 9.40 horas de haber seccionado la fruta.

A semejanza del caso de la pera, en el aguacate existe una diferencia evidente entre la muestra a la que se le aplicó ciclodextrina y la muestra control. El color verde brillante característico del fruto cambió en ambas muestras, sin embargo, los tonos cafés se presentan básicamente en toda la superficie de la muestra control, en tanto que para la muestra a la que se le agregó ciclodextrina el pardeamiento enzimático fue menos importante.

Con los resultados obtenidos visualmente se puede afirmar que el uso de las ciclodextrinas efectivamente puede retardar el oscurecimiento enzimático.

5. CONCLUSIONES

- ❖ A través de la aplicación de las técnicas de voltamperometría cíclica y simulación digital, se estudió un proceso importante para la solución de un problema real: el pardeamiento enzimático en frutas y verduras y su disminución debido al efecto inhibitor de las ciclodextrinas en la oxidación de los ácidos o-difenólicos, los ácidos protocatecuico, caféico y clorogénico.
- ❖ En el medio prótico estudiado se observó que la oxidación de los tres compuestos o-difenólicos es un proceso cuasi-reversible involucrando la ganancia de dos electrones y la consecuente pérdida de dos protones.
- ❖ Se investigó por simulación digital el mecanismo de oxidación de los ácidos o-difenólicos, el cual se da en cuatro pasos. Se encontró que tanto el mecanismo ECEC como el mecanismo ECCE, explican satisfactoriamente el mecanismo de oxidación de los compuestos a sus correspondientes quinonas.
- ❖ Se comprobó que bajo las condiciones experimentales utilizadas, se da el fenómeno de inclusión entre los compuestos o-difenólicos y las α - y β -ciclodextrinas. Esto se puso de manifiesto con la paulatina disminución de la corriente anódica en los voltamperogramas al aumentar la concentración de ciclodextrina.
- ❖ Los complejos de inclusión que se forman, provocan que los sustratos o-difenólicos que participan en la reacción de formación del complejo no puedan ser reconocidos por las enzimas polifenoloxidasas, de esta manera se retarda el oscurecimiento enzimático y los nutrimentos (al menos los antioxidantes fenólicos) permanecen en su forma activa.

- ❖ La simulación digital de los voltamperogramas cíclicos experimentales permitió determinar cuantitativamente las constantes de formación de los complejos de inclusión.
- ❖ En prácticamente todos los casos se forman complejos de inclusión con valores de K_f del orden 10^3 M^{-1} mostrando que la formación del complejo es un proceso favorable. Se comprobó que los compuestos o-difenólicos prefieren estar incluidos dentro de la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina, que estar en su forma libre.
- ❖ El método electroquímico aplicado (voltamperometría cíclica) permite la estimación simultánea de la constante de formación (K_f) del producto de la reacción anódica y la determinación del coeficiente de difusión del complejo de inclusión, parámetros que no se obtienen por los métodos alternativos como calorimetría o espectroscopía UV-vis.
- ❖ Considerando los valores de las constantes de formación y el análisis estadístico, se pudo notar que los compuestos o-difenólicos pueden formar complejos de inclusión con la α -ciclodextrina o la β -ciclodextrina por igual. Además, los valores de las constantes de formación determinadas por calorimetría concordaron con los determinados por voltamperometría cíclica.
- ❖ En base a los resultados experimentales realizados en muestras biológicas se pudo comprobar que la adición de ciclodextrinas retarda el oscurecimiento enzimático por lo que se abre una ventana de oportunidad para disminuir las pérdidas económicas anuales que se derivan del oscurecimiento enzimático de los alimentos.

6. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Al haber logrado determinar con éxito que los tres compuestos o-difenólicos se incluyen satisfactoriamente en las α - y β -ciclodextrinas evitando el deterioro por oscurecimiento enzimático en los alimentos estudiados, considero que es importante investigar los siguientes puntos:

1. Si otros compuestos o-difenólicos presentes en los alimentos logran una buena interacción con las ciclodextrinas.
2. Si la adición de ciclodextrinas no cambian el valor nutricional ni las propiedades organolépticas de los alimentos.
3. Si la concentración de los compuestos o-difenólicos en las muestras biológicas tratadas con ciclodextrinas se mantenga a lo largo del tiempo.
4. La factibilidad de escalamiento del proceso.
5. El análisis costo/beneficio, considerando la cantidad de ciclodextrina que es necesario agregar a los alimentos mas el proceso de aplicación, con respecto al ahorro que se obtiene al disminuir las pérdidas económicas por el deterioro en frutas, verduras así como también crustáceos.

Bibliografía

¹ Brown, T. L., “Química la ciencia central”; Ed. Pearson Education; novena edición, México; 2004. Capítulo 20, 778-779.

² Garrido, A., Teijón J. M., Fundamentos de Bioquímica Estructural; Segunda Edición; Ed. Tébar; Madrid 2006. Capítulo 27, 407-408.

³ Ariza M., Bijur GN., Williams M., Environmental Metal Pollutants Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity. Ed. Kluwer Academic Publishers. E.U.A. 1999. Página 149.

⁴ Nolasco, A. E. Propiedades Antioxidantes de la α -Mangostina. Tesis de licenciatura (Química de Alimentos). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008. Capítulo 1, 10-11.

⁵ Hodgson E., Smart RC. Introduction to Biochemical Toxicology. Third Edition. Ed. John Wiley Interscience. USA 2001. Capítulo 15, 344-345.

⁶ Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon M. Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones Prácticas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 2001. Página 280.

⁷ Martínez, G., Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. Revista Cubana de Farmacia. **2005**, 39: (3).

⁸Madhavi, D.; Deshpande, S.; Salunkhe, D. Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives. Marcell Dekker, Inc. New York. 1996. Capítulo 6, 375-380

⁹ Cadenas, E.; Lester, P. Handbook of Food Antioxidants. Marcell Dekker. Second edition. New York 2002. Capítulos 1, 10, 12, 14, 15 y 16.

¹⁰ Nordberg, J.; Arnér, S.J.E.; Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *J. Free Radical Biology and Medicine*. **2001**, 31: (1287-13129).

¹¹ Wade, L., Química orgánica; Quinta edición. Ed. Pearson Education. Madrid 2004. Capítulos 16, 20 y 25.

¹² Fennema O., Química de los Alimentos; Segunda edición, Ed. Acribia; S. A Zaragoza, España; 2000. Capítulos 5, 7, 12 y 13

¹³ Cubero N., Monferrer A., Villalta J., “Aditivos Alimentarios” Ed. Mundi-Prensa. España 2002. Página 122.

¹⁴ Badui D., Química de los Alimentos; Tercera edición; Ed. Alhambra Mexicana; México, 1993. Páginas 259-265.

¹⁵ Marinova, E.M.; Nedyalka, V.Y.; Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures *J. Food Chemistry*. **2003**, 81: (189-197).

¹⁶ Coultate, T.; Food chemistry; Ed. The Royal Society of Chemistry; UK; 2009. Página 281.

¹⁷ Caballero, B.; Trugo, L.; Finglas, P. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press. San Diego, California. 2003. Página 573

¹⁸ McMurry J., Química Orgánica; 5^a edición; Ed. Thomson Editores; México, 2008. Página 631.

¹⁹ Aguilar M., Ortiz J., Sandoval J., Embriogénesis Somática en Platanos y Bananos. Perspectivas y Limitaciones; Boletín Técnico/CATIE numero 27; Costa rica; 2008. Página 40.

²⁰ Lester, P.; Midori, H.; Toshikazu, Y. Antioxidant Food Supplements in Human Health. Academic Press. San Diego, California. 1999. Capítulos 26 y 28.

²¹ Faller, A. L. K., Fialho E., Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Food Composition and Analysis*. **2010**, 23(6): (561-568).

²² Kono, Y.; Kobayashi, K.; Tagawa, S.; Adachi, K.; Ueda, A.; Sawa, Y.; Shibata H. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1997**, 1335: (335-342).

- ²³ <http://www.food-info.net/uk/> Responsable de la página: Universidad de Wageningen, Holanda. Pagina consultada el 15/07/2011
- ²⁴ Mattila, P.; Hellstrom, J.; Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products *J. Food Composition and Analysis*. **2007**, *20*: (152-1609).
- ²⁵ Barrett, D., Somogyi, L., Ramaswamy, H.; Processing Fruits: Science and Technology, segunda edición. 2005. Páginas 572-578.
- ²⁶ Iwahashi, H.; Ishii, T.; Sugata, R.; The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide. *J. Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1990**, *276*: (242-247).
- ²⁷ Mei Lu., Bo Yuan., Maomao Zeng., Jie Chen.; Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *J. Food Research International*. **2011**, *44*: (530-536).
- ²⁸ Marshall, M. R.; Kim, J.; Wei, Cheng-I.; Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods. Food Science and Human Nutrition Department University of Florida. FAO 2000. Disponible en:
<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>
.Consultado el 06/09/2011.
- ²⁹ Hernández, V. S., Caracterización Electroquímica de Complejos de Inclusión de Ácidos Protocatecuico, Cafeico y Clorogénico con alfa y beta Ciclodextrinas. Tesis de licenciatura (Químico). Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010. Páginas 5-7, 24-33.

- ³⁰ Kornsteiner, M.; Wagner, K.; Elmadfa, I.; Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *J. Food Chemistry*. **2006**, 98: (381-387).
- ³¹ Martínez, M.V.; Whitaker, J.R.; The biochemistry and control of enzymatic browning *J. Trends in Food Science and Technology*. **1995**, 6: (195-200).
- ³² Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.C.; Lerici, C.R.; Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *J. Trends in Food Science and Technology*. **2001**, 11: (340-346).
- ³³ Iyengar, R.; McEvily, A.J.; Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *J. Trends in Food Science and Technology*. **1992**, 3: (60-64).
- ³⁴ Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., Colak, A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chem*. **2008**, 106(1): (291-298).
- ³⁵ Faller, A. L. K., Fialho E., (2010) Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Food Composition and Analysis*. **2010**, 23(6): (561-568).
- ³⁶ Vela Casado Juan, "Purificación y caracterización cinética de polifenol oxidasa de tomate". España. Disponible en:
http://www.lluisvives.com/servlet/SirveObras/01604074325695063002257/013113_1.pdf. Consultado el 07/05/2011.
- ³⁷ Connors, K. A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev*. **1997**, 97: (1325-1357).

- ³⁸ Nepogodiev, S. A., and Stoddart, J. F.; Chemistry of cyclic oligosaccharides. Carbohydrate Chemistry. Blackie Academic and Professional. 1998. UK. 322-325.
- ³⁹ Contreras-Quiñones, H.J.; Cyclodextrinas: Naturaleza, propiedades y aplicaciones (version 1). Universidad de Guadalajara. México. 2001. Páginas 14-17.
- ⁴⁰ Gornas, P.; Neunert, G.; Bacsynski, K.; Polewsky K.; Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *J. Food Chemistry*. **2009**, 114: (190-196).
- ⁴¹ Mosher, G. Thompson, D. o.; Complexation and cyclodextrins. *Encyclopedia of Pharmaceutics Technology*. 2006, 531-558.
- ⁴² Loftsson, T., Magnúsdóttir, A., Másson, M., Sigurjónsdóttir, J. F., (2002) Self Association and Cyclodextrin Solubilization of Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sci.* **2002**, 91(11): (2307-2316).
- ⁴³ Szejtli, J.; Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. **1998**, 98(5): (1743-1754).
- ⁴⁴ Menon, K. I.; Assesment of the Antiprotozoal Activity of some Tubulin Inhibitors Following Cyclodextrin Complexation. Tesis Doctoral. Murdoch University. Australia. 2002. Capítulo 1.
- ⁴⁵ Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U.C.; Biotechnological applications of cyclodextrins. *J. Biotechnology Advances*. **2002**, 20: (341-359).
- ⁴⁶ Martin del Valle, E.M.; Cyclodextrins and their uses: a review. *J. Process Biochemistry*. **2004**, 39: (1033-1046).

- ⁴⁷ http://www.cyclolab.hu/page.htm?whatsnew_0.htm. Consultada el 22/07/2011
- ⁴⁸ Alvarez-Parrilla, E., De la rosa, L. A., Torees-Rivas, F., García, J., Gonzáles- Aguilar, G.; Complexation of Apple Antioxidants: Clorogenic acid, quercetina and rutin by b-cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom and Macrocyclic Chem.* **2005**, 53(1): (121-129).
- ⁴⁹ Loftsson, T., and Brewter, M. E.; Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins 1. *Journal of Pharmaceutical Sci.* **1996** 85(10): (1017-1025).
- ⁵⁰ Srinivasan, K., Vaheethabanu, J., Manisankar, P., Stalin, T.; Study of inclusión complejo of B-cyclodextrin and ortho anisidine; photophysical and electrochemical behaviors. *Molecular Structure.* **2010**, 987(1-3): (214-224).
- ⁵¹ L. Jinxia, M. Zhanga, J . Chaoa y Shuang S., *Spectrochim. Parte Acta de 73* (2009), (752-756).
- ⁵⁴ Matsue, T.; Osa, T.; Evans D.H.; N. Kobayashi. Electron-transfer reactions associated with host-guest complexation. Oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of .beta.-cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107: (3411-3416).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Electroanalytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jelechem

Extension of electrochemical methods of study of inclusion complexes to the case where the guest molecule undergoes a multielectron, multiproton electrode reaction: Study of phenolic acids forming inclusion complexes with α - and β -cyclodextrins

Norma A. Macías-Ruvalcaba^{a,*}, Martha Aguilar-Martínez^a, Silvia Pérez-Casas^a, Salvador Hernández^a, Elisa Mejía^a, Dennis H. Evans^{b,*}

^aFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México

^bDepartment of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2011

Received in revised form 13 July 2011

Accepted 18 July 2011

Available online xxx

Keywords:

Inclusion complexes

Cyclodextrin

Phenolic acids

Cyclic voltammetry

ABSTRACT

Cyclic voltammetry has been employed to determine formation constants for the inclusion complexes formed from α - and β -cyclodextrin and three phenolic acids, protocatechuic (PTC), caffeic (CAF) and chlorogenic (CHL) acids. The method required the prior determination of the mechanism of oxidation of the phenolic acids in the absence of cyclodextrin. The study was conducted in unbuffered aqueous 1.0 M KCl using a glassy carbon working electrode. The voltammetric results could be accounted for equally well by the electron transfer/proton transfer/electron transfer/proton transfer (eHeH mechanism) or the electron transfer/proton transfer/proton transfer/electron transfer (eHHe mechanism). Upon addition of cyclodextrin to solutions of one of the phenolic acids, the anodic peak current for oxidation of the free acid was depressed as was the associated cathodic peak. There was also an increase of the anodic-to-cathodic peak potential separation. Simulation of the cyclic voltammograms allowed the extraction of the formation constant for inclusion of the phenolic acid in the cyclodextrin, K_{c4} , as well as estimation of the formation constant for the oxidized phenolic acid (*o*-quinone) with the cyclodextrin, K_{c5} . The diffusion coefficients of the complexes were also determined. Values of K_{c4} were determined under the same conditions using microcalorimetry and these results, along with literature values, were compared with those obtained by cyclic voltammetry. Underlying causes of the differences are discussed.

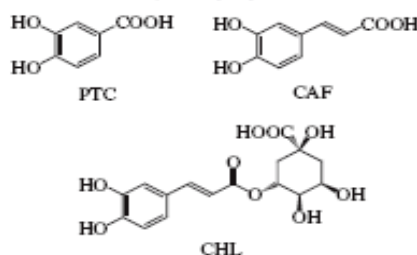
© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrochemical methods have been widely applied to the study of host–guest interactions, often with cyclodextrins as host molecules [1–29]. In the vast majority of cases it is the guest molecule that shows electrochemical activity and the effect of addition of host on this activity provides information about the equilibrium constant of binding and sometimes the rate constant. Such studies have been reviewed [30]. With a few exceptions [15,18,20,22–24,29] the guest molecule undergoes a simple, one-electron electrode reaction, such as with ferrocene derivatives as guests. Of course, these guests are chosen because of the simplicity of electrode reactions while sacrificing the relevance of the results to real applications of host–guest complexation.

Protocatechuic (PTC), caffeic (CAF) and chlorogenic (CHL) acids are the principal natural antioxidants present in fruits and

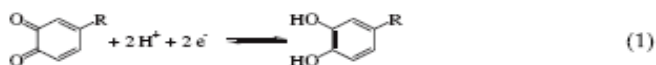
vegetables [31]. They are often called phenolic acids. However, enzymatic oxidation of these molecules leads to colored products (browning) but this deleterious process can be hindered by the addition of cyclodextrins which presumably form inclusion complexes with the phenolic acids making the antioxidant molecules poor substrates for the enzymes [32].



The phenolic acid guest molecules can easily be investigated by electrochemistry owing to their two-electron, two-proton oxidation to *o*-quinones (Reaction (1)). However,

* Corresponding authors. Tel.: +1 765 494 5454; fax: +1 765 494 0329 (D.H. Evans).

E-mail address: evansd@purdue.edu (D.H. Evans).



this is a complicated reaction involving four individual steps, two proton transfers and two electron transfers. We have chosen to use cyclic voltammetry for the studies taking advantage of the fact that it is possible to obtain accurate modeling of the results using modern simulation techniques.

The first step in the development of the method was to determine the mechanism of oxidation of the phenolic acids in the absence of cyclodextrin along with the relevant parameter values describing that oxidation. With that information in hand, we then studied the effect of adding cyclodextrin on the electrochemistry of the phenolic acids. In this way we were able to obtain the equilibrium constants for formation of the 1:1 inclusion complex along with the diffusion coefficient for the complex. Data for both α - and β -cyclodextrin were obtained.

2. Experimental

2.1. Materials

Material, source: 3,4-Dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), Aldrich $\geq 97.0\%$. 3,4-Dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), Sigma–Aldrich $\geq 98.0\%$. 1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate) (chlorogenic acid), Aldrich. Ferrocenemethanol, Aldrich 97%. α -Cyclodextrin (α -CD), Sigma $\geq 98.0\%$. β -Cyclodextrin (β -CD), Sigma $\geq 98.0\%$. Potassium chloride, Sigma Ultra, $\geq 99.0\%$. All reagents were used as received. The water was distilled and deionized.

2.2. Electrochemistry

Cyclic voltammetry experiments were done using a conventional jacketed three-electrode cell, with glassy carbon working electrode of 0.3-cm diameter and Ag/AgCl (saturated KCl) as reference electrode, both from Bioanalytical Systems. A platinum wire was used as counter electrode. The highly polished glassy carbon electrode was repolished before use with 0.05 μm alumina paste (Buehler), rinsed with water, and sonicated for 5 min in distilled water. It was then rinsed with acetone and dried with a tissue. Voltammograms were recorded in 1.0 M KCl/H₂O at 25 °C. Solutions were purged with ultra high purity nitrogen, Praxair, which was presaturated with the solvent before entering the cell. For the addition of α -CD, stock solutions were prepared and added in aliquots with a micropipette to obtain the different concentrations required. β -CD, due to its low solubility (1.85 g/100 mL), was directly added as a solid to the solution of the analyte. Voltammograms of the catechols in the presence of increasing amounts of CD were recorded at 0.1 V/s. Sonication was used to assist dissolution of the phenolic acids.

An Autolab PGSTAT 302 N potentiostat–galvanostat was used for all the experiments. The total uncompensated solution resistance was determined as described earlier [33], using a series of voltammograms of known concentrations of ferrocenemethanol as reference compound. The diffusion coefficient and heterogeneous rate constant of ferrocenemethanol used in the simulation work were those reported by Miao, Ding and Bard, $D = 7.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $k_s = 2.06 \text{ cm s}^{-1}$ [34]. The uncompensated resistance of the 1.0 M KCl solution was 20 Ω . The area of the working electrode was determined to be 0.069 cm^2 . All the cyclic voltammograms were recorded without electronic compensation of the solution resistance, so the total resistance was included in the simulations.

Simulations were carried out using DigiElch 4.F, a software package for the Digital simulation of common Electrochemical

experiments (<http://www.elchsoft.com>) [35]. When matching simulations to the experimental voltammograms, the objective was to find the single set of parameter values that provided the best average agreement between simulation and experiment for the entire range of scan rates that were employed. This means that a simulation at a given scan rate might be improved by some variation of one or more simulation parameter values but this would lower the average goodness-of-fit for the entire set of voltammograms. We have not been able to find a reliable method of estimating the error in parameter evaluation for this multi-variable fitting process. A rough estimate of the indeterminate error is $\pm 5 \text{ mV}$ for standard potentials, ± 0.02 for electron transfer coefficients, $\pm 10\%$ for equilibrium and rate constants and $\pm 10\%$ for diffusion coefficients of reactants.

Controlled-potential coulometry was carried out in a 75-mL electrolysis cell from Bioanalytical Systems. Reticulated vitreous carbon was used as the working electrode. A platinum wire separated from the bulk of the solution by a glass frit was used as a counter electrode. The reference electrode was Ag/AgCl (saturated KCl) and coulometry was carried out at room temperature.

2.3. Calorimetry

The differences between the experimental heats and the enthalpies of dilution for the titration of solutions containing the catecholic compound with cyclodextrin were determined at 298.15 K in 1.0 M KCl/H₂O. The calorimetric measurements were made by means of a thermal activity monitor (TAM) (Thermometric, Sweden) equipped with a 2201 high performance ampoule calorimeter unit with a 4 mL micro-reaction system and a Lund syringe pump with control box. Prior to the start and at the end of each experiment, an electric calibration of the calorimetric unit was carried out in order to adjust the power sensor in the cells. The calorimeter allows the subtraction of the enthalpy of dilution of the injected solution from the total enthalpy of the process by means of a simultaneous titration of the solvent (1.0 M KCl) with the cyclodextrin. The concentration of the catecholic compound present in the cell (1.5 mM for PTC and CHL; 0.8 mM for CAF) was much smaller than the concentration of cyclodextrin (10 mM) in the syringe, so its enthalpy of dilution is negligible. The injectors as well as the collection of titration data were controlled by a microcomputer.

Under the assumption that 1:1 complex forms, the association process can be represented as follows: $\text{CD} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CD}\cdot\text{L}$ where CD indicates the cyclodextrin and L any of the guest substances employed. The heats of mixing of the two binary solutions, subtracted from the heats of dilution experienced by the two solutes gives the enthalpy of formation of the complex, ΔH° , that can be expressed as a function of the actual molality of the guest molecule, m_i^\pm , of the standard molar enthalpy of association, ΔH° , and the apparent association constant, K_a as follows [36]:

$$\frac{\Delta H^\circ}{m_{\text{CD}}} = \frac{m_i^\pm \Delta H^\circ K_a}{(1 + m_i^\pm K_a)} \quad (2)$$

or in a linear form, useful for fitting the data:

$$\frac{m_{\text{CD}}}{\Delta H^\circ} = \frac{1}{\Delta H^\circ} + \frac{1}{\Delta H^\circ K_a m_i^\pm} \quad (3)$$

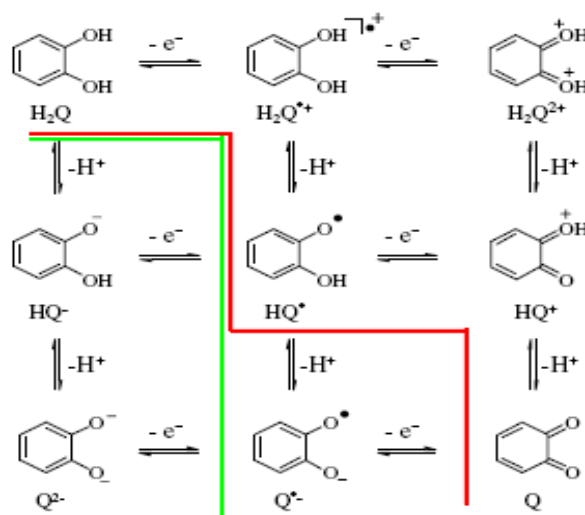
The standard enthalpy and the formation constant are obtained from Eq. (3) by an iterative least squares method through the digi-tam 4.1 software of TAM.

3. Results

3.1. Mechanism of electrochemical oxidation of phenolic acids, PTC, CAF and CHL

Preliminary studies of the oxidation revealed that reproducible results could not be obtained in buffered aqueous solution. However, unbuffered solutions allowed reproducible results to be obtained using 1.0 M KCl as supporting electrolyte. As each phenolic acid contains a carboxylic acid moiety, the solutions were not neutral, but slightly acidic. In practice, the pH of the samples was measured and the proton activity so obtained was converted to concentration using an activity coefficient for the hydronium ion of 0.80, appropriate for an ionic strength of 1.00 M [37]. Thus, as the oxidation of the phenolic acids occurs, the protons produced (Reaction (1)) will be added to those already present from dissociation of the reactant. Dissociation of the phenolic protons is negligible at the pH of our solutions, pH = 3–4. In addition, we have assumed that oxidation reactions of the minority carboxylate anions ($R'-CO_2^-$) are identical to those of the neutral acid ($R'-COOH$ where R' denotes the remainder of the molecule). Because the carboxylate and carboxylic acid forms will be in very rapid equilibrium with protons, the rate and equilibrium constants that are extracted from the data will be intermediate between those of the acid and base forms of the phenolic acid. For chlorogenic acid (CHL), the differences are probably quite small as the carboxylic acid group is far removed from the electroactive *o*-diphenol (catechol) moiety.

Typical voltammograms for the three phenolic acids are shown in Fig. 1. The oxidation mechanism can be described by the various possible pathways through the nine-membered square scheme (Scheme 1). Here, the unsubstituted catechol (H_2Q ; top left structure) represents any of the three phenolic acids. The horizontal reactions in the scheme are electron-transfer reactions while the vertical reactions are proton transfers. The initial step in the oxidation could be either proton loss (vertical) or electron loss (horizontal). However, at the acidic pH values present in this work proton loss as a first step is unlikely as the pK_a of the catechol proton is 8.6–8.8 [38,39]. Thus electron loss (horizontal), forming $H_2Q^{•+}$



Scheme 1. Nine-membered square scheme for oxidation of a catechol to the corresponding *o*-quinone. Horizontal reactions are electron transfers and vertical are proton transfers.

(middle species, top row) appears to be the most likely first step in the oxidation. The second step can again be either electron transfer giving H_2Q^{2+} (horizontal) or proton transfer (vertical) to produce HQ^{\bullet} (central species). The latter is more likely because electron transfer would require formation of the very high energy species, H_2Q^{2+} , which is doubly protonated quinone. Thus, the most likely first two steps of oxidation are electron transfer forming $H_2Q^{•+}$ followed by proton transfer to produce HQ^{\bullet} .

HQ^{\bullet} also has two different reaction paths available: electron loss to form H_2Q^{2+} (middle species, right-hand column) or proton loss to give $Q^{\bullet-}$ (middle species, bottom row). The fourth and final reaction step is either proton loss (vertical) or electron loss

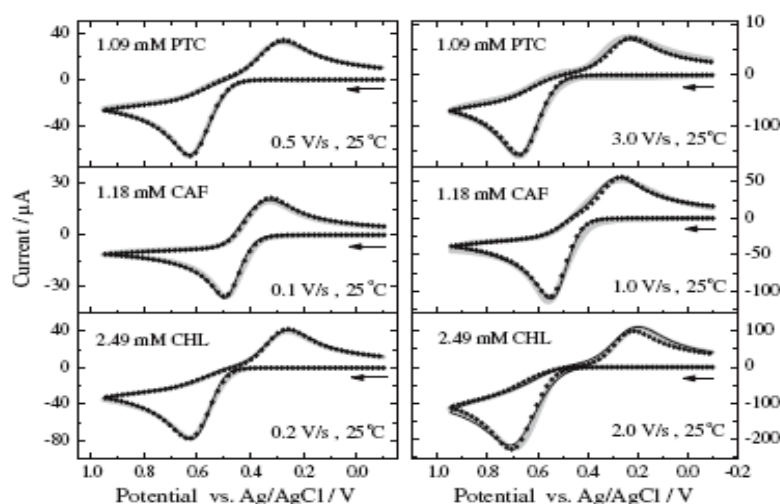


Fig. 1. Examples of the fits to the experimental voltammograms (light grey solid line) of PTC, CAF and CHL using the $eHeH$ (filled circles) and $eHeH$ (black solid line) mechanisms with the simulation parameter values as shown in Tables 1 and 2, respectively.

Table 1
Simulation parameters according to the eHeH mechanism (green line, Scheme 1) for PTC, CAF and CHL in 1.0 M KCl at 25 °C.^a

	mM	$H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{+} + e^{-}$			$Q^{-} \rightleftharpoons Q + e^{-}$		
		E^0/V	α	$k_f/cm\ s^{-1}$	E^0/V	α	$k_f/cm\ s^{-1}$
<i>Electrochemical reactions</i>							
PTC	1.09	0.567	0.48	5.6×10^{-3}	0.435	0.44	1.0×10^{-2}
PTC	2.19	0.605	0.48	5.6×10^{-3}	0.436	0.44	1.0×10^{-2}
CAF	0.61	0.574	0.40	0.40	0.498	0.64	1.1×10^{-2}
CAF	1.18	0.578	0.40	0.40	0.486	0.64	1.1×10^{-2}
CHL	1.18	0.709	0.60	3.7×10^{-2}	0.356	0.52	1.2×10^{-2}
CHL	2.49	0.653	0.60	3.0×10^{-2}	0.399	0.52	1.2×10^{-2}
	mM	$H_2Q^{+} \rightleftharpoons HQ^{+} + H^{+}$		$HQ^{-} \rightleftharpoons Q^{-} + H^{+}$		$[H^{+}]^b$ mM	$10^6 D/cm^2\ s^{-1}$
		K	k_f/s^{-1}	K	k_f/s^{-1}		
<i>Chemical reactions</i>							
PTC	1.09	8.1×10^{-4}	1.0×10^6	1.0×10^{-2}	1.0×10^6	0.16	6.94
PTC	2.19	8.0×10^{-4}	1.0×10^6	1.0×10^{-2}	1.0×10^6	0.22	6.88
CAF	0.61	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	2.8×10^{-2}	1.0×10^7	0.07	7.45
CAF	1.18	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	2.8×10^{-2}	1.0×10^7	0.10	7.20
CHL	1.18	3.0×10^{-2}	1.0×10^6	8.1×10^{-3}	1.0×10^6	0.66	5.43
CHL	2.49	3.0×10^{-2}	1.0×10^6	8.1×10^{-3}	1.0×10^6	0.38	5.49

^a The same values were used to fit all scan rates from 0.05 to 3.00 V/s. The total of the solution resistance (20 Ω) was included in the simulations. Except for H^{+} species, the diffusion coefficient value, D , was set equal to the shown value for all species. D of H^{+} was set to $9.3 \times 10^{-5} cm^2/s$ [40].

^b $[H^{+}]$ was obtained from the experimental measurement of the pH of the solution of the corresponding phenolic acid in 1.0 M KCl.

Table 2
Simulation parameters according to the eHeH mechanism (red line, Scheme 1) for PTC, CAF and CHL in 1.0 M KCl at 25 °C.^a

	mM	$H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{+} + e^{-}$			$HQ^{-} \rightleftharpoons HQ^{+} + e^{-}$		
		E^0/V	α	$k_f/cm\ s^{-1}$	E^0/V	α	$k_f/cm\ s^{-1}$
<i>Electrochemical reactions</i>							
PTC	1.09	0.601	0.48	1.4×10^{-2}	0.403	0.47	1.4×10^{-3}
PTC	2.19	0.647	0.48	1.4×10^{-2}	0.396	0.47	1.4×10^{-3}
CAF	0.61	0.505	0.40	3.0×10^{-2}	0.384	0.50	2.7×10^{-3}
CAF	1.18	0.513	0.40	3.0×10^{-2}	0.373	0.50	2.7×10^{-3}
CHL	1.18	0.611	0.60	2.0×10^{-2}	0.315	0.50	4.7×10^{-3}
CHL	2.49	0.643	0.60	2.0×10^{-2}	0.299	0.50	4.7×10^{-3}
	mM	$H_2Q^{+} \rightleftharpoons HQ^{+} + H^{+}$		$HQ^{+} \rightleftharpoons Q + H^{+}$		$[H^{+}]^b$ mM	$10^6 D/cm^2\ s^{-1}$
		K	k_f/s^{-1}	K	k_f/s^{-1}		
<i>Chemical reactions</i>							
PTC	1.09	2.7×10^{-3}	1.0×10^6	4.5×10^{-4}	1.0×10^4	0.16	7.01
PTC	2.19	2.7×10^{-3}	1.0×10^6	4.5×10^{-4}	1.0×10^4	0.22	6.88
CAF	0.61	3.5×10^{-4}	1.0×10^5	2.9×10^{-3}	1.0×10^5	0.07	7.20
CAF	1.18	3.5×10^{-4}	1.0×10^5	2.9×10^{-3}	1.0×10^5	0.10	7.20
CHL	1.18	1.0×10^{-2}	1.0×10^6	1.0×10^{-4}	1.0×10^4	0.66	5.60
CHL	2.49	1.0×10^{-2}	1.0×10^6	1.0×10^{-4}	1.0×10^4	0.38	5.74

^a The same values were used to fit all scan rates from 0.05 to 3.00 V/s. The total solution resistance (20 Ω) was included in the simulations. Except for H^{+} species, the diffusion coefficient, D , was set equal to the value shown for all species. D of H^{+} was set to $9.3 \times 10^{-5} cm^2/s$ [40].

^b $[H^{+}]$ was obtained from the experimental measurement of the pH of the solution of the corresponding phenolic acid in 1.0 M KCl.

(horizontal), each giving the o-quinone, Q (right-hand, bottom species). Finally, we conclude that the two most likely oxidation pathways are $H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{+} + e^{-}$; $H_2Q^{+} \rightleftharpoons HQ^{+} + H^{+}$; $HQ^{+} \rightleftharpoons HQ^{-} + e^{-}$; $HQ^{-} \rightleftharpoons Q + H^{+}$ on the one hand and $H_2Q \rightleftharpoons H_2Q^{+} + e^{-}$; $H_2Q^{+} \rightleftharpoons HQ^{+} + H^{+}$; $HQ^{+} \rightleftharpoons Q^{-} + H^{+}$; $Q^{-} \rightleftharpoons Q + e^{-}$ on the other. These have come to be known as the eHeH and the eHHe reaction pathways, respectively, where "e" denotes an electron-transfer step and "H" a proton transfer. For 4-methylcatechol, the eHeH and eHHe mechanisms have both been shown to be important in the slightly acidic pH range [41].

In Scheme 1, the unsubstituted catechol represents any of the phenolic acids studied in this work. Red line: the eHeH pathway. Green line: the eHHe pathway (see text)¹.

As shown in Fig. 1, the quality of the fits for the eHeH and eHHe mechanisms was about the same. Simulation parameter values used to fit the cyclic voltammograms are given in Tables 1 and 2.

Similarly good fits were obtained for scan rates from 0.05 to 3.00 V/s. Simulations of the oxidation of the phenolic acids in the presence of cyclodextrins were conducted using the eHeH mechanism though it was found that equivalent results were obtained using the eHHe.

Controlled potential coulometric oxidation of PTC, CAF and CHL required the transfer of 2.9, 2.3 and 1.7 electrons per molecule, respectively and produced a complex mixture of products as revealed by thin-layer chromatography, suggesting that on the time scale of the experiment side reactions are occurring, probably involving the reactive o-quinone that is formed by oxidation of the phenolic acid. None of the final products was identified.

3.2. Oxidation of phenolic acids, PTC, CAF and CHL, in the presence of α - or β -cyclodextrin

Inclusion of the three phenolic acids in the cavity of α - or β -cyclodextrin was studied by cyclic voltammetry over the range of 0–10 mM cyclodextrin. Representative results are shown in Fig. 2

¹ For interpretation of color in Scheme 1 and Fig. 2, the reader is referred to the web version of this article.

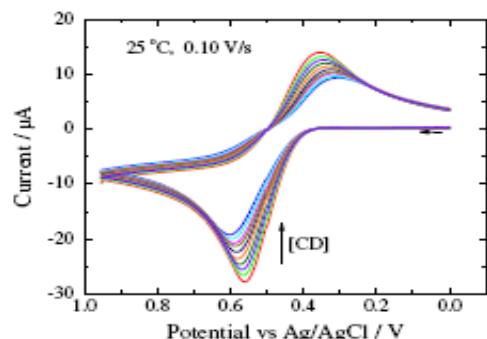


Fig. 2. Cyclic voltammograms of 1.09 mM PTC in presence of increasing amounts of α -cyclodextrin (0.0–6.0 mM).

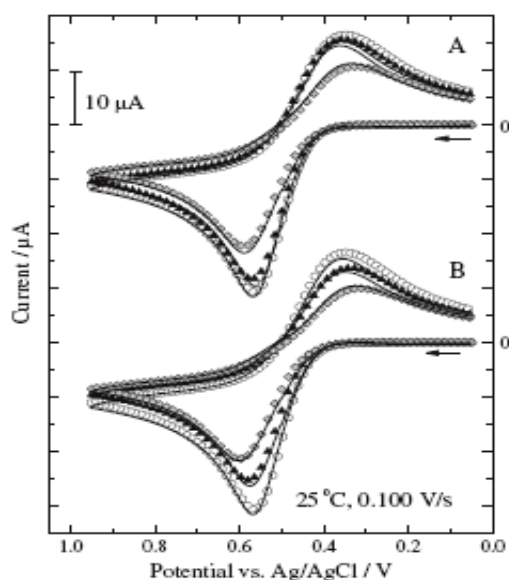


Fig. 3. Experimental voltammograms (solid lines) of 1.05 mM PTC in 1.0 M KCl in the absence of α -cyclodextrin (circles) and in the presence of 0.99 mM (triangles, A), 2.44 mM (triangles, B), 4.31 mM (diamonds, A) and 5.70 mM (diamonds, B) α -cyclodextrin. Symbols are simulations according to the eHeH mechanism along with complexation reactions (4) and (5), with $K_{e,4}$ and $K_{e,5}$ values as shown in Table 3.

and qualitatively the same behavior is seen for all three phenolic acids with either of the cyclodextrins. In Fig. 2 it may be seen that both anodic and cathodic peak currents diminish as the concentration of cyclodextrin increases. This is attributed to the smaller diffusion coefficient of the inclusion complex compared to the free phenolic acid with the relative amount of the free phenolic acid decreasing as more and more of the cyclodextrin is added. The underlying assumption here is that the complexed phenolic acid is unable to react at the electrode so that dissociation of the complex must take place before oxidation can occur. Thus, the amount of current that is observed can depend on both the extent of complexation and also the rate of association/dissociation.

It can also be noticed in Fig. 2 that the difference in peak potentials, $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$, increases substantially with increasing concentrations of cyclodextrin. This is a manifestation of chemical

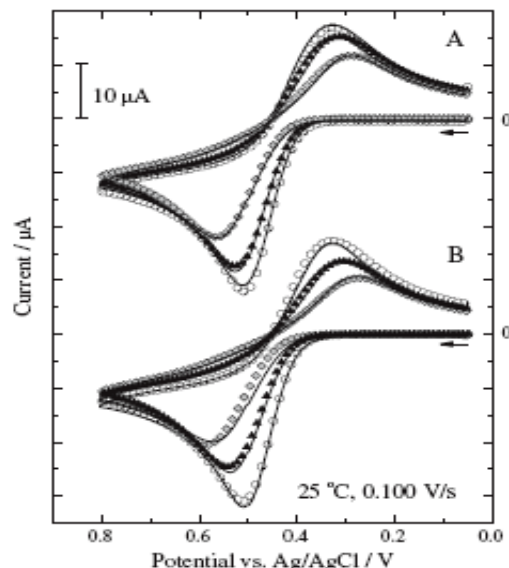


Fig. 4. Experimental voltammograms (solid lines) of 1.17 mM CHL in 1.0 M KCl in the absence of β -cyclodextrin (circles) and in the presence of (triangles, A) 1.01 mM, 2.14 mM (triangles, B), 4.52 mM (diamonds, A) and 7.79 mM (diamonds, B) β -cyclodextrin. Symbols are simulations according to the eHeH mechanism along with the complexation reactions (4) and (5), with $K_{e,4}$ and $K_{e,5}$ values as shown in Table 3.

reactions (association/dissociation) preceding or following an electrode reaction that is not entirely reversible [42].

Also of interest is the almost perfect “isopotential point” at about zero current and +0.5 V. Though such behavior has been seen in other cases with all participants in the reaction being solution species [43–45], it is not clear why it appears here. The only obvious thing that it has in common with other systems is that the voltammograms are obtained for a series of solutions with a constant value of the total concentration of electroactive species (the phenolic acid) with the relative amount of the two forms (the free and complexed phenolic acid) varying [43].

Analysis of the voltammograms of the phenolic acids in the presence of cyclodextrin was carried out by simulation. The following assumptions were made:

1. Only the free phenolic acid (H_2Q) can react at the electrode. The bound phenolic acid is electrochemically inert.
2. The free phenolic acid is oxidized via the eHeH mechanism found for studies of the phenolic acid in the absence of cyclodextrin. (It was found that the eHeH mechanism gave almost identical results).
3. The simulation parameter values obtained in the absence of cyclodextrin (Table 2) were assumed to be unchanged in the presence of cyclodextrin.
4. The rates of the phenolic acid/cyclodextrin association/dissociation reactions are fast.
5. The formation constant used in the simulation is for only one form of the phenolic acid, reaction (4). That is, the carboxylic acid and carboxylate forms are assumed to behave identically.
6. The product of the oxidation, the free *o*-benzoquinone derivative, can also be bound by the cyclodextrin, reaction (5).

In our initial efforts no binding of the quinone was assumed but we later found that inclusion of a binding constant for the *o*-benzoquinone product (Q) with the cyclodextrin, reaction (5), brought

Table 3

Formation constants for the inclusion complexes of phenolic acids with cyclodextrins as determined by digital simulation of cyclic voltammograms, 298 K, 1.00 M aqueous KCl.

Phenolic acid	Cyclodextrin	$K_{f,4}/M^{-1}$	$K_{f,5}/M^{-1}$	D_c/D_f
PTC	α -CD	500	50	0.35
		640 ^a		
PTC	β -CD	750	300	0.36
		360 ^a		
		264 ^b		
CAF	α -CD	3500	50	0.35
		1300 ^a		
CAF	β -CD	1000	80	0.30
		480 ^a		
		278 ^c		
CHL	α -CD	1500	100	0.44
		790 ^a		
CHL	β -CD	626 ^b	300	0.50
		900		
		1200 ^a		
		522 ^d		
		424 ^c		

^a Microcalorimetry, 298 K, 1.00 M aqueous KCl.

^b Ultraviolet absorption, 298 K, pH 6.5, 0.10 M ionic strength. Ref. [32].

^c Fluorescence studies, 298 K, pH 7. Ref. [47].

^d Ultraviolet absorption, 298 K, pH 6.5, 1.4 M ionic strength. Ref. [32].

about an improvement in the fits. Specifically, the cathodic peak for the



reduction of Q was not sufficiently negative when simulations were conducted without reaction (5).

Comparisons of simulations with experimental voltammograms for PTC in absence and presence of α -cyclodextrin are shown in Fig. 3 with similar results for CHL in Fig. 4. Values of $K_{f,4}$ and $K_{f,5}$ are given in Table 3, including the results for simulation of CAF voltammograms as well. The simulations are also sensitive to the value of the diffusion coefficient of the complex, D_c , and it was found that the ratio of D_c to the diffusion coefficient of the free phenolic acid, D_f , that best fit the data was in the range of 0.35–0.50 (Table 3).

For comparison, results of microcalorimetric determination of the equilibrium constants are also given in Table 3 along with a few results from the literature.

4. Discussion

Cyclic voltammetric oxidation of three phenolic acids, PTC, CAF and CHL, has been successfully modeled in aqueous 1.00 M KCl and a glassy carbon electrode. The oxidation proceeds with four separate steps, two electron transfers and two proton transfers. Our results can be accounted for equally well by an electron transfer followed by proton transfer and then by a second electron transfer with subsequent proton transfer (the eHeH mechanism) or by an initial electron transfer followed by two consecutive proton transfers and a final electron transfer (eHHe mechanism). The simulation of the results is novel particularly for an unbuffered aqueous solution (see, however, Ref. [46]).

The effect of adding α - or β -cyclodextrin to solutions of the phenolic acids is as expected. The anodic peak current for oxidation of the phenolic acid decreases in magnitude as the concentration of the cyclodextrin is increased. This is due to the fact that the fraction of the phenolic acid present in the inclusion complex increases with increasing cyclodextrin concentration and the diffusion coefficient of the inclusion complex is only about 40% of that of the free

phenolic acid. There are also distinctive changes in the shape of the voltammograms including shifts in the peak potentials.

Digital simulation of voltammograms obtained in the presence of cyclodextrin were carried out with the addition of two reactions, a complexation reaction between the phenolic acid (which is a catechol, H_2Q) and the cyclodextrin and a less important complexation between the oxidized form (an o-quinone, Q) and the cyclodextrin. These complexation/dissociation reactions were assumed to be very fast reactions. The results were accommodated by considering only 1:1 complexation, in accord with the literature [32,47]. The formation constants of the three phenolic acids with both α - and β -cyclodextrin were determined by simulation of the cyclic voltammograms and also by microcalorimetry. The two determinations were carried out under the same conditions, 1.00 M aqueous KCl and 298 K. The agreement is only moderately good (Table 3). The same can be said of the agreement of the values obtained by simulation of the cyclic voltammograms with some reported in the literature that were obtained by fluorescence or ultraviolet absorption methods. In these latter cases however, some experimental details were different including the pH and ionic strength.

In fact, the pH may be the most important factor explaining the difference between the electrochemical and microcalorimetric determinations. Each experiment begins with a solution of the phenolic acid of known pH. In microcalorimetry the pH should not change as the cyclodextrin is added. In electrochemistry, however, the pH near the electrode surface will decrease as the initial positive-going scan is carried out because oxidation of the phenolic acid introduces protons into the unbuffered solution. Conversely, the pH will increase during the return negative-going scan as the product quinone is reduced back to the phenolic acid (catechol). Though we carefully included this variation in pH in our simulations, we may be seeing an example of the failure of assumption 5 where, in the electrochemical case, we assume that the carboxylate and carboxylic acid forms behave identically. As the pH changes during the scan, the fraction present as the acid and base form of the phenolic acid will vary.

We conclude that the electrochemical method that was developed in this paper has the advantage of allowing study of systems that are of real relevance to an important problem: the effect of adding cyclodextrins to the browning process. This is because we have been able to successfully model the complex, four-step oxidation of the phenolic acids and then to see the effect of added cyclodextrin. The disadvantage, compared to other methods, is that, in spite of our best efforts, there appear to be some factors at work to cause differences between the equilibrium constants so obtained and those measured by alternative accepted methodologies.

Added information, not obtainable by alternative methods, includes estimation of the formation constant of the product of the anodic reaction reacting with cyclodextrin and the determination of the diffusion coefficient of the inclusion complex.

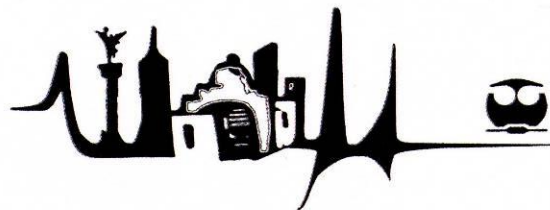
Acknowledgments

This work was supported by the UNAM through DGAPA project IN203208 and the US National Science Foundation, Grant CHE-0948606.

References

- [1] T. Matsue, D.H. Evans, T. Osa, N. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3411–3417.
- [2] J. Taraszweska, A.K. Flasecki, *J. Electroanal. Chem.* 226 (1987) 137–146.
- [3] A.D. Ryabov, E.M. Tyapochkin, S.D. Varfolomeev, A.A. Karyakin, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 24 (1990) 257–262.
- [4] K. Kano, K. Mori, B. Uno, M. Goto, T. Kubota, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8645–8649.

- [5] M.J. Nuwer, J.J. O'Dea, J.G. Osteryoung, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 10070–10076.
- [6] V.V. Strelets, I.A. Mamedjarova, M.N. Nefedova, N.I. Pysnograeva, V.I. Sokolov, L. Pospíšil, J. Hanzlík, *J. Electroanal. Chem.* 310 (1991) 179–186.
- [7] A. Essalim, D. Serve, *Electrochim. Acta* 37 (1992) 149–157.
- [8] S. McCormack, N.R. Russell, J.F. Cassidy, *Electrochim. Acta* 37 (1992) 1939–1944.
- [9] T. Carofiglio, F. Magno, I. Lavagnini, *J. Electroanal. Chem.* 373 (1994) 11–17.
- [10] C. Retna Raj, R. Ramaraj, *J. Electroanal. Chem.* 405 (1996) 141–147.
- [11] X.-J. Dang, J. Tong, H.-L. Li, *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* 24 (1996) 275–286.
- [12] X.-J. Dang, M.-Y. Nie, J. Tong, H.-L. Li, *J. Electroanal. Chem.* 437 (1997) 53–59.
- [13] C. Retna Raj, R. Ramaraj, *Electrochim. Acta* 44 (1999) 2685–2691.
- [14] E. Coutouli-Argyropoulou, A. Kelaidopoulou, C. Sideris, G. Kokkinidis, *J. Electroanal. Chem.* 477 (1999) 130–139.
- [15] J.-F. Bergamini, J. Belabbas, M. Jouini, S. Aeiyaich, J.-C. Lacroix, K.I. Chane-Ching, P.-C. Lacaze, *J. Electroanal. Chem.* 482 (2000) 156–167.
- [16] D. Osella, A. Carretta, C. Nervi, M. Ravera, R. Gobetto, *Organometallics* 19 (2000) 2791–2797.
- [17] T. Komura, T. Yamaguchi, K. Noda, S. Hayashi, *Electrochim. Acta* 47 (2002) 3315–3325.
- [18] Z.-N. Gao, X.-L. Wen, H.-L. Li, *Polish J. Chem.* 76 (2002) 1001–1007.
- [19] N. Iki, S. Ogawa, T. Matsue, S. Miyano, *J. Electroanal. Chem.* 610 (2007) 90–95.
- [20] F.C. de Abreu, D.C.M. Ferreira, M.O.F. Goulart, O. Buriez, C. Amatore, *J. Electroanal. Chem.* 608 (2007) 125–132.
- [21] Y. Ling, J.T. Mague, A.E. Kaifer, *Chem. Eur. J.* 13 (2007) 7908–7914.
- [22] C. Yañez, J. Basualdo, P. Jara-Ulloa, J.A. Squella, *J. Phys. Org. Chem.* 20 (2007) 499–505.
- [23] C. Amatore, O. Buriez, E. Labbé, J.-N. Verpeaux, *J. Electroanal. Chem.* 621 (2008) 134–145.
- [24] C. Yañez, R. Basquinzay, *J. Electroanal. Chem.* 622 (2008) 242–245.
- [25] J. Caballero, C. Zamora, D. Aguayo, C. Yañez, F.D. González-Nilo, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 10194–10201.
- [26] N.V. Nastapova, A.S. Stepanov, V.V. Yanilkin, V.A. Burilov, V.V. Skripacheva, A.R. Mustafina, S.E. Solov'eva, A.I. Kononov, *Russ. J. Electrochem.* 45 (2009) 783–794.
- [27] M. Hromadová, R. Sokolová, L. Pospíšil, S. Lachmanová, N. Fanelli, S. Giannarelli, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74 (2009) 1647–1664.
- [28] J. Jankolovits, J.W. Kampf, S. Maldonado, J.L. Pecoraro, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 6786–6796.
- [29] J.-P. Song, Y.-J. Guo, S.-M. Shuang, C. Dong, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 68 (2010) 467–473.
- [30] S. Gadde, E.K. Batchelor, A.E. Kaifer, *Aust. J. Chem.* 63 (2010) 184–194.
- [31] E.M. Marinova, N.V. Yanishlieva, *Food Chem.* 81 (2003) 189–197.
- [32] P.L. Irwin, P.E. Pfeffer, L.W. Doner, G.M. Sapers, J.D. Brewster, G. Nagahashi, K.B. Hicks, *Carbohydr. Res.* 256 (1994) 13–27.
- [33] N.A. Macías-Ruvalcaba, D.H. Evans, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 14642–14647.
- [34] W. Miao, Z. Ding, A.J. Bard, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 1392–1398.
- [35] M. Rudolph, *J. Electroanal. Chem.* 543 (2003) 23–29.
- [36] M. Eftink, R. Biltonen, in: A.E. Beezer (Ed.), *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, London, 1980, pp. 343–412.
- [37] L. Pezza, M. Molina, M. de Moraes, C.B. Melios, J.D. Tognoli, *Talanta* 43 (1996) 1689–1695.
- [38] F.Z. Erdemgil, S. Şanlı, N. Şanlı, G. Özkan, J. Barbosa, J. Guiteras, J.L. Beltrán, *Talanta* 72 (2007) 489–496.
- [39] J.L. Beltrán, N. Şanlı, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 253–264.
- [40] J.J. Lingane, *J. Electroanal. Chem.* 2 (1961) 46–52.
- [41] M.R. Deakin, R.M. Wightman, *J. Electroanal. Chem.* 206 (1986) 167–177.
- [42] J.-M. Savéant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry*, Wiley, New York, 2006 (Chapter 2).
- [43] A. Fitch, G.J. Edens, *J. Electroanal. Chem.* 267 (1989) 1–13.
- [44] M. Zelić, M. Lovrić, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74 (2009) 1489–1501.
- [45] M. Zelić, M. Lovrić, *J. Electroanal. Chem.* 637 (2009) 28–32.
- [46] M. Quan, D. Sanchez, M.F. Wasylkiw, D.K. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 12847–12856.
- [47] P. Górnas, G. Neunert, K. Baczyński, K. Polewski, *Food Chem.* 114 (2009) 190–196.

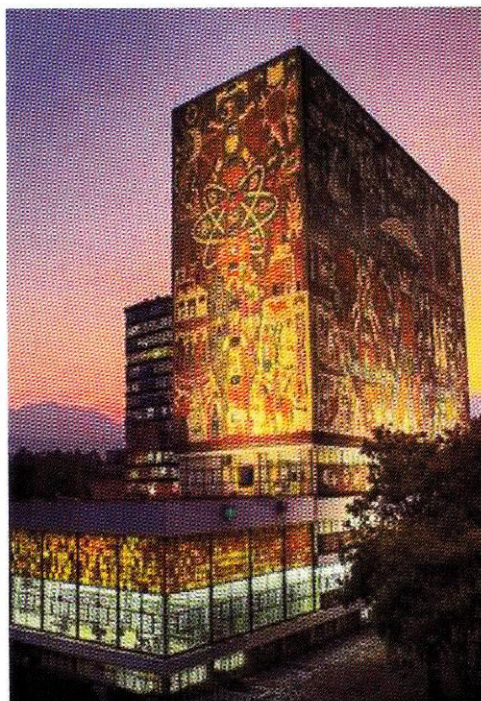


30 de mayo al 03 de junio de 2011
Ciudad de México

La Sociedad Mexicana de Electroquímica

Otorga la presente constancia a:

*E. Mejía Jácome, M. Aguilar Martínez, S. Pérez Casas, S. G.
Hernández Vargas, N. A. Macías Ruvalcaba*



Por su participación en el XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 4th Meeting of The Mexican Section of the Electrochemical Society

Con el trabajo titulado

Caracterización electroquímica y calorimétrica de complejos de inclusión de antioxidantes o-difenolicos naturales con α - y β - ciclodextrinas.

Dr. Manuel Palomar Pardavé
Presidente SMEQ

Dr. Francisco J. Rodríguez Gómez
Presidente del Comité organizador

